

LENIR BASSO ZANON

**ESTUDOS DOS EFEITOS TÓXICOS DE  
DIMETILDITIOCARBAMATO DE ZINCO EM  
MITOCÔNDRIAS ISOLADAS DE FÍGADO**

Tese apresentada ao Departamento de  
Bioquímica da Universidade Federal  
do Paraná, para a obtenção do título  
de "MESTRE EM BIOQUÍMICA".

Orientador: Dr. Dinor O. Voss

CURITIBA  
1978

Dedico

a meus queridos pais

## ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO .....	5
2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	13
3 - RESULTADOS .....	17
4 - DISCUSSÃO .....	34
5 - CONCLUSÃO .....	39
6 - SUMÁRIO .....	41
7 - AGRADECIMENTO .....	43
8 - BIBLIOGRAFIA .....	45
9 - SIGLAS.....	53

## 1. INTRODUÇÃO

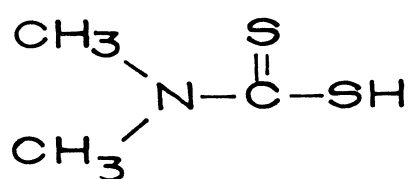
## 1. INTRODUÇÃO

Do mesmo modo que outros agentes tóxicos, os fungicidas têm sido pesquisados quanto à sua atuação como inibidores do metabolismo.

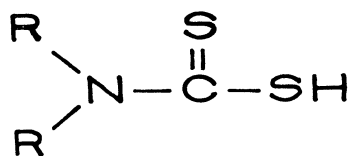
Os fungicidas orgânicos mais amplamente usados são os dialquilderivados do ácido ditiocarbâmico. São muito importantes no controle de doenças vegetais, como desinfetantes para sementes, como "sprays" para pomares e repelentes para insetos. São usados no comércio em tintas e como fungicidas têxteis(44). Estas drogas têm também atraído a atenção dos radiobiologistas, porque são efetivos (em animais experimentais) contra a letalidade da exposição aguda à radiações ionizantes (9). São também usados para o controle de doenças da pele em homens e animais (62). Antes de serem introduzidos como fungicidas, os ditiocarbamatos foram bastante usados na indústria da borracha para acelerar o processo de vulcanização.

O descobrimento dos ditiocarbamatos como fungicidas é comparável ao descobrimento do DDT como inseticida, sendo que precedem a introdução do DDT por vários anos (62). Há dois tipos de ditiocarbamatos usados como fungicidas: os dialquilditiocarbamatos (DDC) e os etilenobisditiocarbamatos, cujos mecanismos de ação parecem ser diferentes (56, 65).

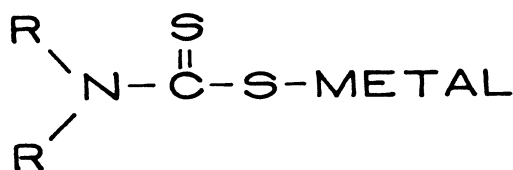
O sal de zinco do ácido dimetilditiocarbâmico é preferível aos demais, devido à maior solubilidade em água e a outras características favoráveis ao uso como pesticida (61). É formado pela junção de duas moléculas de ácido dimetilditiocarbâmico através de um átomo de zinco.



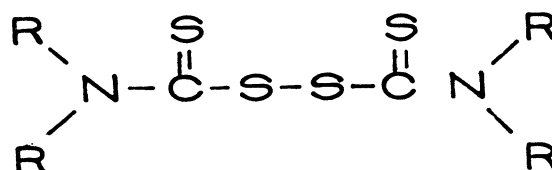
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 1 - Estruturas básicas dos ditiocarbamatos.

- A = ácido dimetilditiocarbâmico
- B = ácido dialquilditiocarbâmico
- C = dialquilditiocarbamatos metálicos
- D = tetraalquiltiuram dissulfetos

Nomenclatura comercial do ZDDC: Ziram, Zerlate, Mathasan, Zimate, Fuclazin, Corozate, Opalet, Karban White, Zirberk, ZDDC, Niagara Z-C, Carbazinc.

Toxidez a mamíferos (LD 50 mg/Kg)

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
|  | (rato = 500 mg/Kg                  |
| a) por via oral                              | {                                  |
|  | (coelho = 400 mg/Kg                |
|  | (rato = 1400 mg/Kg                 |
| b) por via estomacal                         | {                                  |
|  | (cobaia e coelho = 100-300 mg/Kg   |
|  | (camundongo = 17 mg/Kg             |
| c) por via intraperitonal                    | {                                  |
|  | (rato, coelho, cobaia = 5-73 mg/Kg |
| d) por via sub-cutânea (em óleo de amendoim) | {rato = 785 mg/Kg                  |

O ZDDC foi primeiramente usado para combater a antracnose do tomate. Depois passou a ter uso mais geral contra doenças causadas por fungos em cereais, batata, tomate, frutas e outros; também contra doenças de folhas em cucúrbitas, cenoura, beterraba, pimenta e ainda para evitar o apodrecimento da batata e de frutas (44).

De acordo com o rótulo da embalagem de Fungitox (uma das fórmulas comerciais do ZDDC que contém 90% da droga em veículo inerte), o ZDDC é indicado para o tratamento das seguintes doenças de vegetais: antracnose, ferrugem, requeima, pinta preta, sarna, podridão amarga, podridão parda, cercoporiose, queima, mancha preta, míldio, septriose, mancha angular e ácaro da ferrugem.

Vários estudos já foram feitos a respeito do mecanismo de ação tóxica de ditiocarbamatos em fungos e outros organismos unicelulares.

MANTEN et al (37) determinaram a sensibilidade ao TMTD (tetrametil-tiuram dissulfeto, produto de oxidação de dimetilditiocarbamato de sódio), em relação aos diferentes tipos de metabolismos em vários microrganismos. Elaboraram o espectro antimicrobial do TMTD para 27 espécies, incluindo bactérias, leveduras e fungos. Em geral a toxidez é maior para fungos do que para bactérias. Sugeriram que a droga age primariamente interferindo no processo assimilatório do metabolismo dos microrganismos.

Uma peculiaridade interessante dos compostos DDC é a resposta bimodal para a curva de dosagem na toxidez para fungos (41, 65, 69, 70, 71). No início, o aumento gradual da concentração leva a um aumento correspondente na toxidez;

depois de certo ponto, aumentando-se a quantidade de droga, há uma diminuição gradual da toxidez. Posterior aumento na dosagem (além do ponto de inversão) torna a toxidez novamente crescente. A teoria mais aceita para a resposta bimodal é de que os compostos DDC formam dois tipos de complexos com íons de cobre (adicionados ao meio de crescimento) causando:

- a) 1ª zona de inibição: devido à forma  $\text{Cu}(\text{DDC})^+$
- b) zona de inversão: devido à forma  $\text{Cu}(\text{DDC})_2$
- c) 2ª zona de inibição: devido ao íon  $\text{DDC}^-$  livre

Segundo SIJPESTEIJN e JANSEN (65) bactérias Gram-positivas são muito sensíveis ao NaDDC, sendo que para Bacillus subtilis não há inversão do crescimento. Sugeriram um paralelo entre a inibição de enzimas -SH por arsênico e por ditiocarbamatos.

O composto dietil livre é tão tóxico para Aspergillus niger, quanto o dimetil livre. Dipropil exige concentração 10 vezes maior, e o dibutil não é inibidor nem nesta concentração (27, 64). O mesmo ocorre para B. subtilis (65).

De acordo com RICH e HORSFALL (56) o crescimento de A. niger e Penicillium italicum é afetado por 1/25 a 1/100 da dosagem de NaDDC que afeta a respiração; os compostos DDC muito provavelmente atuam interferindo em certos processos assimilatórios. A toxidez foi atribuída ao íon ditiocarbamato, porque diminuindo a ionização, diminui a ação fungitóxica, enquanto que aumentando a ionização, a fungitoxidez aumenta.

O NaDDC inibe o crescimento de Saccharomyces cerevisiae, sendo que ocorre inibição da oxidação do acetato com igual concentração (12). A fermentação anaeróbica da glucose por S. cerevisiae é também fortemente inibida por TMTD, e seria devido à inibição da oxidação do gliceraldeído-3-fosfato (77).

Esporos e micélio de A. niger acumulam ácido pirúvico, quando em presença de NaDDC (69, 71). Em Fusarium roseum, o ZDDC inibe os processos sintéticos que usam  $\alpha$ -cetoglutarato, sem inibir o ciclo da oxidação da glucose, que produz os  $\alpha$ -cetoácidos (78).

LUDWIG et al (35) em 1960 diziam que os estudos até então realizados não eram suficientes para explicar o mecanismo de ação tóxica dos compostos DDC e seus produtos de oxidação. Mesmo sem garantir, consideraram como provável modo de ação, a interação de DDC com grupos sulfidril de enzimas, ou então à remoção de cátions essenciais para os sistemas biológicos.

A ação inibitória de nabam (etilenobisditiocarbamato de sódio) na germinação de esporos de P. italicum e A. niger é fortemente antagonizada por compostos tiólicos como cisteína e ácido tioglicólico (68) sugerindo que a toxicidade de nabam é devida à sua combinação com constituintes da célula que têm grupos -SH essenciais.

Segundo OWENS (45) os fungicidas DDC podem inibir enzimas que dependem, para sua atividade, de grupos amino, grupos sulfidril, Fe ou Cu. SISLER e COX (77) também concordam que os compostos DDC inativam enzimas sulfidril, já que TMTD inibe a fermentação da glucose, frutose -1,6- difosfato e gliceraldeído -3- fosfato por levedura, e que a inibição é revertida por cisteína e glutatión. Constataram que TMTD inibe a triosefosfato desidrogenase.

CHEFURKA (7) demonstrou que os fungicidas DDC inibem fortemente as enzimas sulfidril-dependentes, glucose -6- fosfato desidrogenase e 6- fosfogluconato-desidrogenase, isoladas de Musca doméstica e que a inibição pode ser parcialmente revertida pela adição de cisteína. Concluiu que os fungicidas DDC atuam ao nível de enzimas-sulfidril que pertencem ao caminho da oxidação aeróbica de hexosemonofosfato, no metabolismo de carboidratos.

O acúmulo de ácido pirúvico por A. niger em presença de NaDDC seria devido à interferência com coenzimas que atuam na oxidação do piruvato, como ácido lipóico e coenzima A. (69). SIJPESTEIJN e JANSEN (65) concluíram que os compostos DDC inibem enzimas que têm grupos ditiol essenciais, propondo que as enzimas inibidas são aquelas que requerem ácido dihidrolipóico como coenzima.

NaDDC causa forte inibição da desidrogenase succínica, de tecido animal (28) e sabe-se que existem grupos -SH importantes para atividade da succinato-desidrogenase (2, 14, 15, 23, 24, 28, 73, 74, 76, 79). O ácido dihidrolipóico é necessário para a atividade de desidrogenases ligadas ao caminho da oxidação de  $\alpha$ -ceto ácidos (53, 54, 58).



OWENS (46) notou correlação entre a habilidade dos fungicidas DDC para inibir a polifenoloxidase "in vitro", e sua toxidez a A.niger. Tal correlação não existe para Botrytis cinerea, P.italicum e Rhysopus nigricans. Como os compostos DDC são fortes agentes quelantes, OWENS sugeriu que a inativação de metais poderia ser o principal mecanismo tóxico dos compostos DDC contra certos fungos e não contra outros.

Segundo MANTEN et al (37) o íon ditiocarbamato pode atuar precipitando íons de metais pesados essenciais à célula, ou inativando grupos -SH essenciais para enzimas, pela formação de ligações dissulfeto.

A inativação de metais como mecanismo tóxico para fungicidas DDC foi também referida por RICH e HORSFALL (56). Sugeriram que ZDDC poderia agir inativando metaloenzimas, como as que requerem ferro. O complexo FeDDC (mais estável que ZnDDC) seria formado através da quelação do ferro da enzima com o íon  $\text{DDC}^-$ . ZnDDC é também menos estável que CuDDC (12). SIJPESTEIN et al (71, 65) também estudaram o papel de metais e de agentes quelantes na ação fungitóxica do NaDDC. GOKSØYR (13) também considera importante o papel de metais na fungitoxidez de NaDDC.

Os compostos DDC são inibidores de reações catalizadas por íons cobre e por enzimas que requerem cobre, tal como polifenol oxidase (28, 37). A inibição da oxidação aeróbica do succinato não seria devido ao íon  $\text{DDC}^-$ , mas sim ao seu produto de oxidação, TETD, formado a partir de DDC através de uma oxidação catalizada pelo sistema citocromo, desde que DDC reduz citocromo c.

MANTEN et al (38) estudaram a influência de traços de metais essenciais para o crescimento de A.niger, como Zn, Fe, Cu, Mn e Mo sobre a fungitoxidez de TMTD. Não houve reversão da toxidez pela adição de nenhum dos metais ao meio, nem quando o fungo foi cultivado em condição mais sensível ao TMTD (meio sintético), nem quando foi crescido em estado 100 vezes mais resistente ao agente (meio agar malte). Sugerem que a possível reversão da ação tóxica pelos metais essenciais (como citado anteriormente) poderia ser devido ao fator utilidade e que haveria poucas evidências para dizer que o mecanismo de ação tóxica de TMTD fosse no sentido da teoria de precipitação de metais, ou da formação de complexos com os metais.

É sabido que histidina e outros derivados imidazólicos são capazes de antagonizar a ação inibidora de NaDDC, TMTD e TMTM na germinação de esporos de fungos, na primeira zona de inibição (66, 67). Seria por interação com algumas enzimas, possivelmente por interferência na biossíntese da histidina.

BRIQUET et al (4) constataram a inibição do crescimento de S. cerevisiae por ZDDC, e demonstraram que o efeito primário de ZDDC em mitocôndria de levedura está localizado nas enzimas succinato,  $\alpha$ -cetoglutarato e piruvato desidrogenases. Sugeriram que ZDDC atua em grupos -SH mitocôndriais, o que foi revelado pela titulação direta de grupos -SH de mitocôndrias de levedura em presença do fungicida.

O TETD inibe triosefosfatodesidrogenase isolada de músculo de coelho, e a inibição é revertida por cisteína (42), indicando que TETD afeta grupos -SH essenciais para a união do substrato à enzima (uma vez que há competição entre o inibidor e o substrato para com a enzima). A acetaldeído oxidase de homogenato de fígado é inibida por TETD (65), e ela é uma enzima -SH (25,26).

DUBOIS et al (9) estudaram o efeito de ditiocarbamatos na fase oxidativa do metabolismo intermediário de carboidratos, focalizando a ação em enzimas do Ciclo do Ácido Tricarboxílico que requerem grupos -SH para sua atividade. Observaram inibição do consumo de oxigênio, da utilização de piruvato e da síntese do ácido cítrico por derivados do ácido ditiocarbâmico em homogenato de fígado e rim de ratos. O rim mostrou ser mais afetado que o fígado. Demonstraram que as atividades de  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, piruvato desidrogenase e succinato desidrogenase são fortemente inibidas pelos sais do ácido ditiocarbâmico, "in vivo" e "in vitro". Constataram também, a inibição da enzima tirosinase (uma cuproproteína), sugerindo que ditiocarbamatos são capazes de inibir reações enzimáticas através de sua habilidade de quelação, além da reatividade com grupos -SH essenciais de enzimas ou coenzimas. Observaram que os sais do ácido ditiocarbâmico são inibidores efetivos de enzimas -SH "in vivo" e "in vitro", enquanto que o produto de oxidação TMTD é inibidor "in vivo", mas não tem efeito apreciável na atividade das enzimas "in vivo". A reação direta dos derivados do ácido ditiocarbâmico com enzimas -SH,

seria o mecanismo provável para a ação tóxica.

Apesar dos vários estudos feitos a respeito do mecanismo de ação tóxica em vários organismos, parece pouco tem sido feito no sentido de se esclarecer os efeitos tóxicos dos compostos DDC em animais.

Sabe-se que ditiocarbamatos causam dermatites em pessoas (61) e que foi constatada ação teratogênica em embriões de pinto (39). Metilcarbamatos são teratogênicos quando injetados em ovos de galinha nos primeiros dias de incubação, ou quando administrados a mamíferos de laboratório (5, 11). ZDDC é irritante para as vias respiratórias superiores e para a pele (44).

O processo da respiração celular é de importância vital, sendo que qualquer agente que interfere em tal mecanismo se revela prejudicial à vida. Torna-se importante saber se determinadas drogas impedem a seqüência normal de reações que ocorrem no processo respiratório, incluindo o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, cadeia respiratória e fosforilação oxidativa.

O objetivo do presente trabalho foi investigar a toxidez do fungicida ZDDC ao nível da respiração celular de animais, na tentativa de auxiliar na elucidação dos efeitos tóxicos da droga. Foi estudado o efeito da droga ao nível de mitocôndrias intactas de fígado de rato.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 - Reagentes

ZDDC é um pó branco, insípido, sem cheiro, PM = 306, PF = 246, insolúvel em álcool e éter, pouco solúvel em água (65 ppm) e muito solúvel em clorofórmio. Foi usado dissolvido no solvente orgânico dimetilformamida. As diversas drogas utilizadas foram de origem comercial, da maior pureza disponível.

### 2.2 - Isolamento de Mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas a partir de fígado de rato, como descrito por VOSS et al (83), usando-se meio-de-extração contendo: d-manitol 0,21 M, sacarose 0,075 M, Tris (hidroximetilaminometano) 0,01 M e EDTA (etilenodiamino tetracetato, sal dissódico) 0,1 mM, pH 7,4.

Fígados de ratos albinos, espécie Wistar, foram isolados, logo após decapitação, picotados e suspensos em meio-de-extração gelado, sendo imediatamente triturados em homogeneizador de Van Potter Elvehjen (rompimento das células). O homogenato foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 0° C, marca SORVALL RC-2B, rotor SS-34, a 3.000 rpm, durante 10 minutos, a fim de eliminar restos de células intactas, membranas, e núcleos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 10.000 rpm, durante 10 minutos, a fim de precipitar as mitocôndrias. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em meio-de-extração e centrifugado a 8.000 rpm, por 10 minutos. Esta última operação foi repetida, a fim de se obter mitocôndrias mais puras. Todas as operações foram realizadas a frio, em banho-de-gelo.

### 2.3 - Isolamento da Enzima Succinato Desidrogenase

A enzima succinato desidrogenase foi isolada a partir de fígado de boi, de acordo com o método de SINGER et al (74). A enzima foi extraída do pó cetônico, obtido a partir de mitocôndrias de fígado de boi, sendo purificada através de precipitações com sulfato de amônio e de protamina.

## 2.4 - Métodos de Ensaio

a) Proteínas foram dosadas pelo método de LOWRY et al (34) usando solução de soro albumina bovina cristalina como padrão.

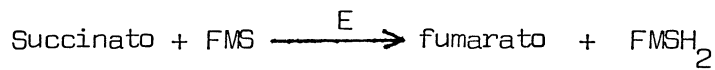
b) O consumo de oxigênio foi avaliado por Respirometria, através do método clássico de WARBURG (82), utilizando como substratos: succinato,  $\alpha$ -ce<sup>to</sup>glutarato, glutamato e isocitrato. O meio-de-reação a pH 7,4 continha : D-manitol 0,25M, Tris 0,01M, EDTA 0,2mM, KCl 0,01M e tampão fosfato 5mM, pH 7,4. O volume final para cada frasco de Warburg foi de 2,85ml, sendo consti<sup>tu</sup>ido de: suspensão mitocondrial (5mg proteínas), KOH 20% (0,15ml no poço cen<sup>tr</sup>al), substratos (100 umoles) e meio-de-reação (q.s.p. 2,85ml). Temperatu<sup>ra</sup> = 38° C. Agitações: 100 por minuto. Fase gasosa: ar atmosférico. Os resultados foram expressos em microlitros de oxigênio consumido nos intervalos de tempos (10-15 minutos).

c) As determinações polarográficas para o consumo de oxigênio e fosforilação oxidativa foram realizadas a 27°C em Eletródo de Oxigênio, como des<sup>cri</sup>tto por VOSS et al (84), fabricado pela firma RANK-BROTHERS, Cam<sup>br</sup>idge, In<sup>g</sup>laterra. Utilizou-se o mesmo meio-de-reação citado para Manometria. A ve<sup>lo</sup>cidade respiratória foi expressa em micromolar de oxigênio por segundo ( $\mu\text{MO. seg}^{-1}$ ). A relação ADP/O foi calculada de acordo com o método descrito por CHANCE e WILLIAMS (6) para ensaio da fosforilação oxidativa; consiste na rela<sup>ção</sup> entre a concentração molar de oxigênio consumido durante o estado ativo (es<sup>ta</sup>dado 3) da respiração, e a concentração molar de ADP que foi adicionado. O coeficiente de controle respiratório (RC) foi calculado como a relação entre a velocidade respiratória com ADP (estado 3) e a velocidade após o consumo de ADP (estado 4).

d) A proteção de grupos -SH mitocondriais contra o efeito inibidor<sup>o</sup> do ZDDC foi estudada, utilizando-se o reagente ditioeritritol (DTT), na concen<sup>tra</sup>ção 2mM. Foram feitos testes de controle, sendo que os resultados apresen<sup>ta</sup>dos estão isentos de possíveis alterações do sistema de ensaio devido à pre<sup>se</sup>nça do DTT.

e) A enzima succinato desidrogenase foi ensaiada através de respiro-

metria e polarografia, baseando-se na sua capacidade de consumir oxigênio, em presença do receptor artificial fenazinametasulfato (FMS), cuja reação geral (30) é:



O consumo de oxigênio foi medido em Respirômetro de WARBURG e em eletródio de oxigênio, sendo que o sistema para ensaio continha: KCN 0,01M, 0,3ml; FMS 1%, 0,1ml; succinato 0,5M, 0,2ml; soro albumina bovina cristalina 1%, 0,1ml e tampão fosfato 0,2M, pH 7,6 q s p 2,85ml. A reação foi iniciada pe la adição da succinato desidrogenase (2mg de proteína). Não foi possível me dir a atividade da enzima espectrofotometricamente, porque ZDDC reage quimicamente com diclorofenolindofenol (DCIP), o receptor para FMSH<sub>2</sub>.

f) O grau de "swelling" mitocondrial foi medido por turbidimetria em espectrofotômetro Beckman DB, a 540 mμ. O sistema constou de: suspensão mi tocondrial (1,5mg proteína), meio de reação (qsp 3ml) e ZDDC.

### 3. RESULTADOS



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 - Concentração limiar do ZDDC para inibição da oxidação do succinato por mitocôndrias de fígado de rato

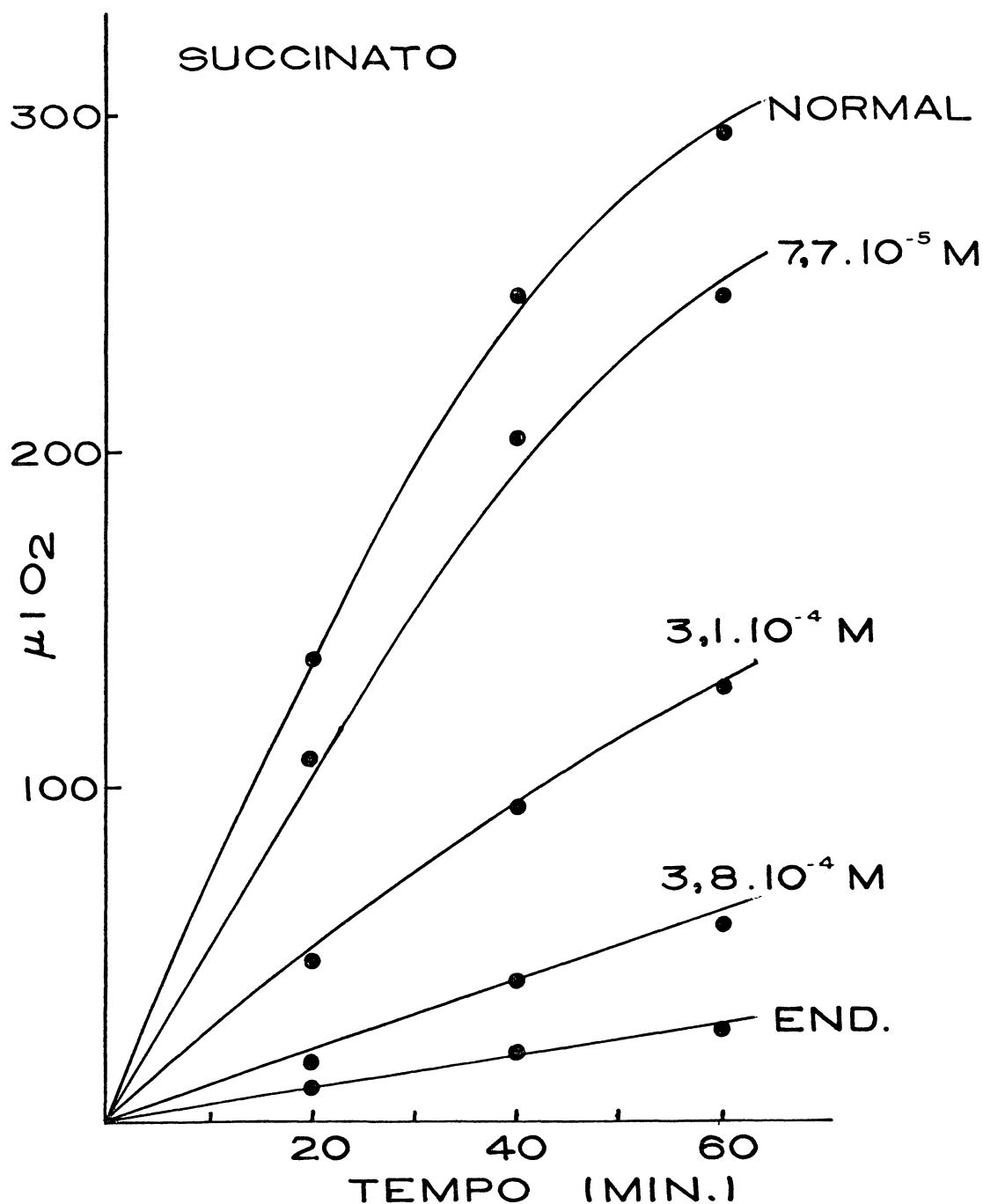


Figura 2 - Efeito do ZDDC sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias de fígado de rato, utilizando-se succinato como substrato. (Respirometria).

Sistema: suspensão mitocondrial (5mg de proteína), succinato de sódio (100  $\mu$  moles), KOH 20% (0,15ml no poço central) e meio de reação (qsp 2,85ml).

3.2 - Concentração limiar do ZDDC para inibição da oxidação de  $\alpha$ -cetoglutarato por mitocôndrias de fígado de rato.

$\alpha$ -CETOGLUTARATO

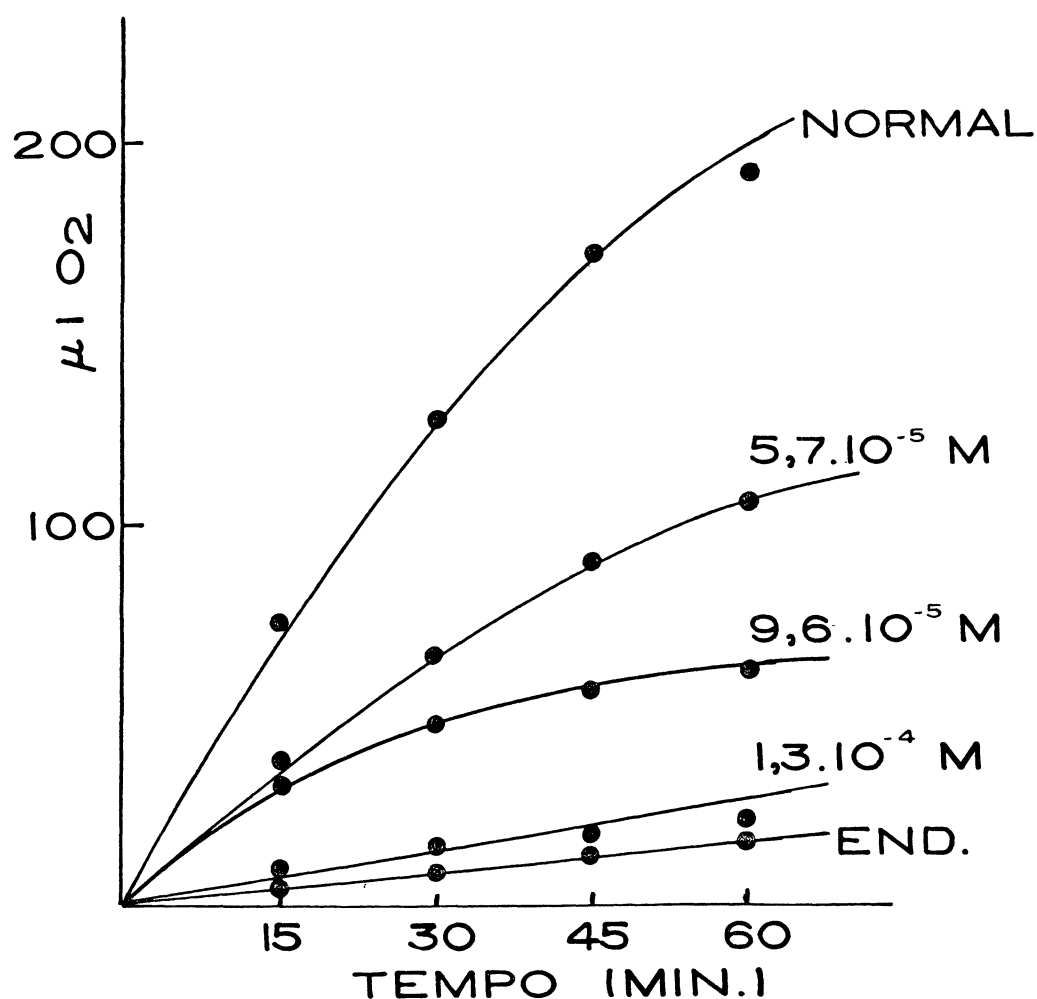


Figura 3 - Efeito do ZDDC sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias de fígado de rato, utilizando-se  $\alpha$ -cetoglutãrato como substrato. (Respirometria).

Sistema: suspensão mitocondrial (5mg de proteína),  $\alpha$ -cetoglutarato de sódio (100  $\mu\text{moles}$ ), KOH 20% (0,15ml no poço central) e meio de reação (qsp 2,85ml).

3.3 - Concentração limiar do ZDDC para inibição da oxidação de glutamato por mitocôndrias de fígado de rato

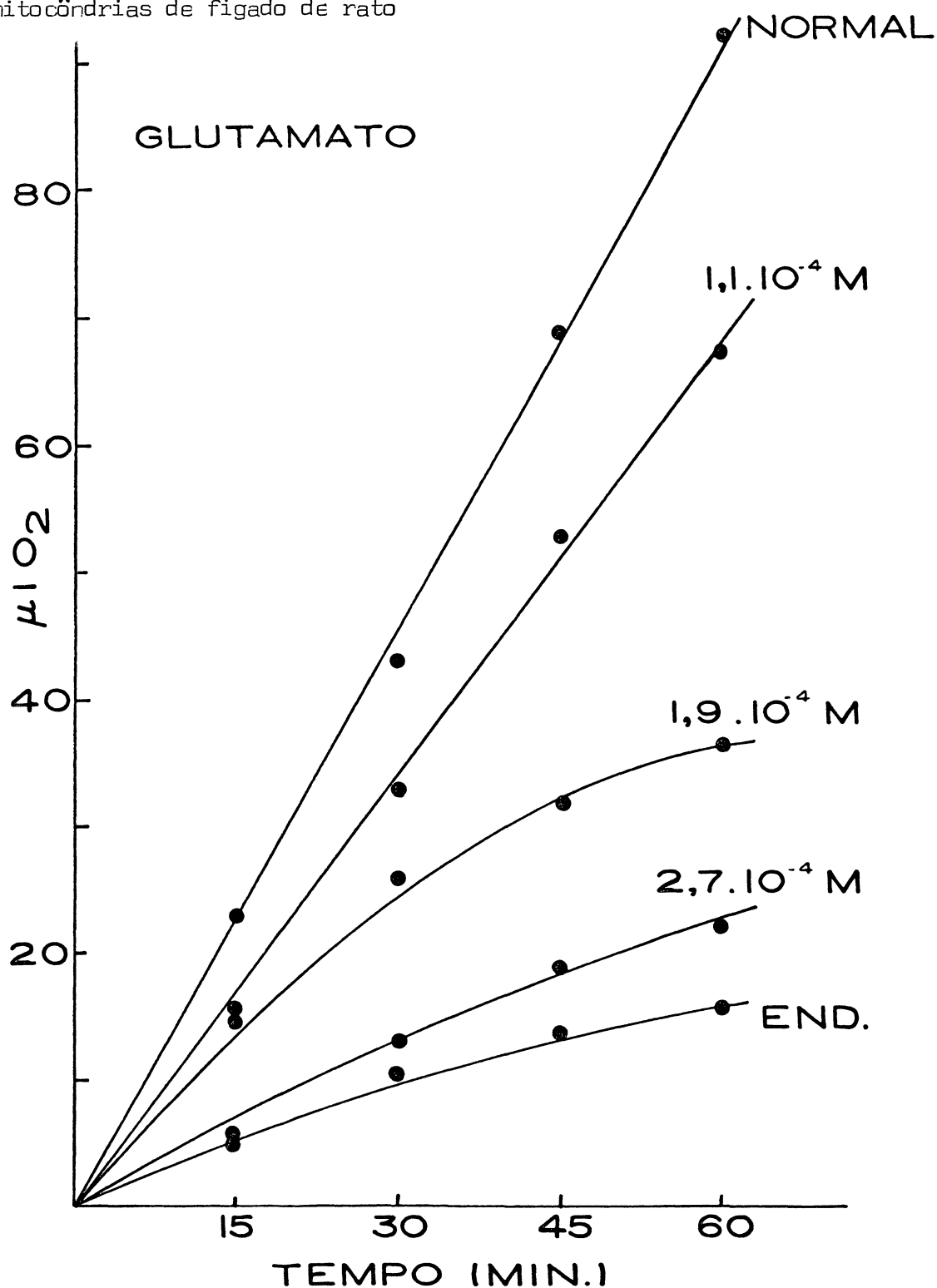


Figura 4 - Efeito do ZDDC sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias de fígado de rato, utilizando-se glutamato como substrato. (Respirometria).

Sistema: suspensão mitocondrial (5mg de proteína), L-glutamato de sódio (100 μmoles), KOH 20% (0,15ml no poço central) e meio de reação (qsp 2,85ml).

3.4 - Concentração limiar de ZDDC para inibição da oxidação de isocitrato por mitocôndrias de fígado de rato.

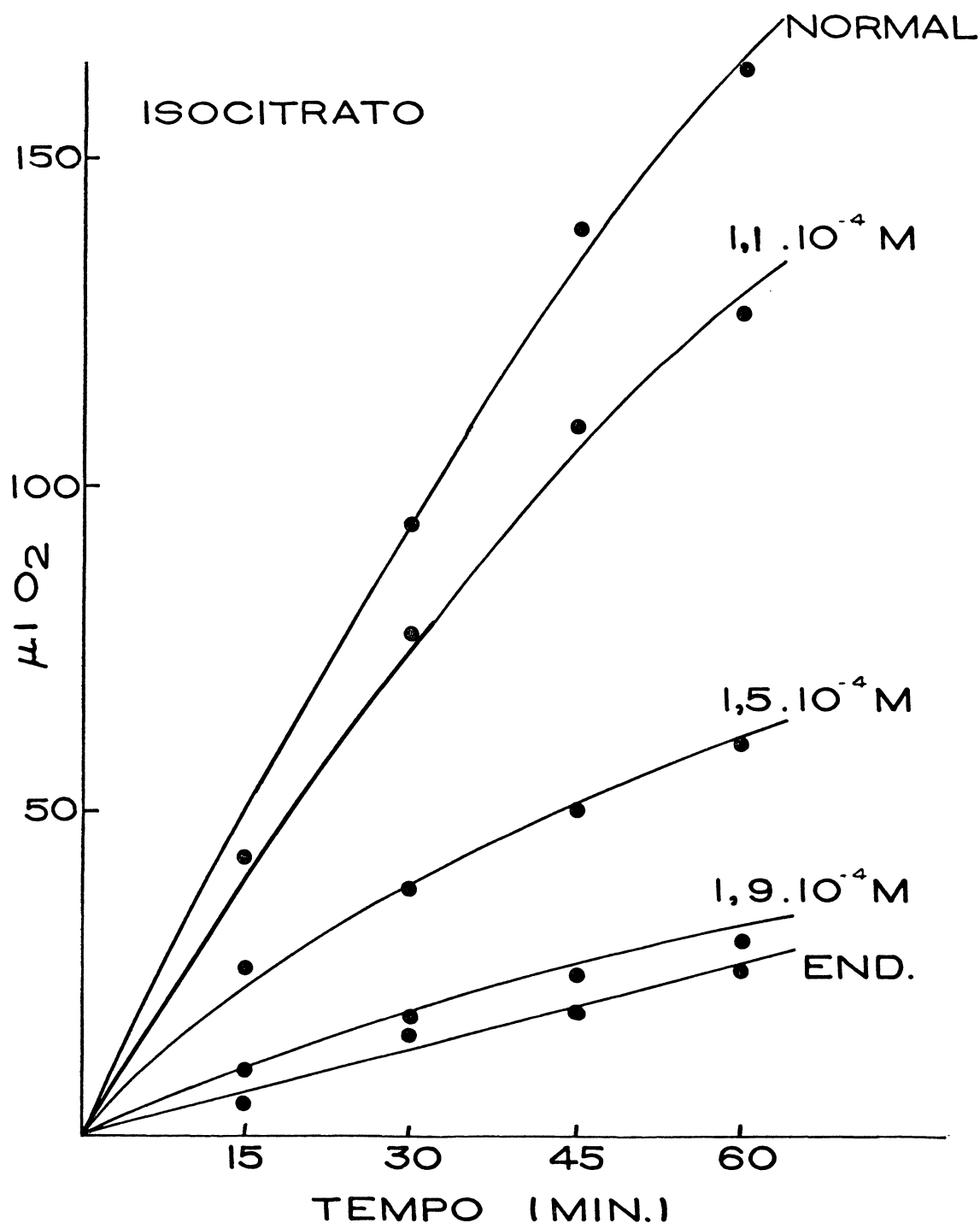


Figura 5 - Efeito do ZDDC sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias de fígado de rato, utilizando-se o isocitrato como substrato (respirometria).

Sistema: suspensão mitocondrial (5mg de proteína), isocitrato de sódio (100 μmoles), KOH 20% (0,15 ml no poço central) e meio de reação (qsp 2,85 ml).

3.5 - Concentração limiar do ZDDC para inibição da fosforilação oxidativa, usando-se succinato como substrato.

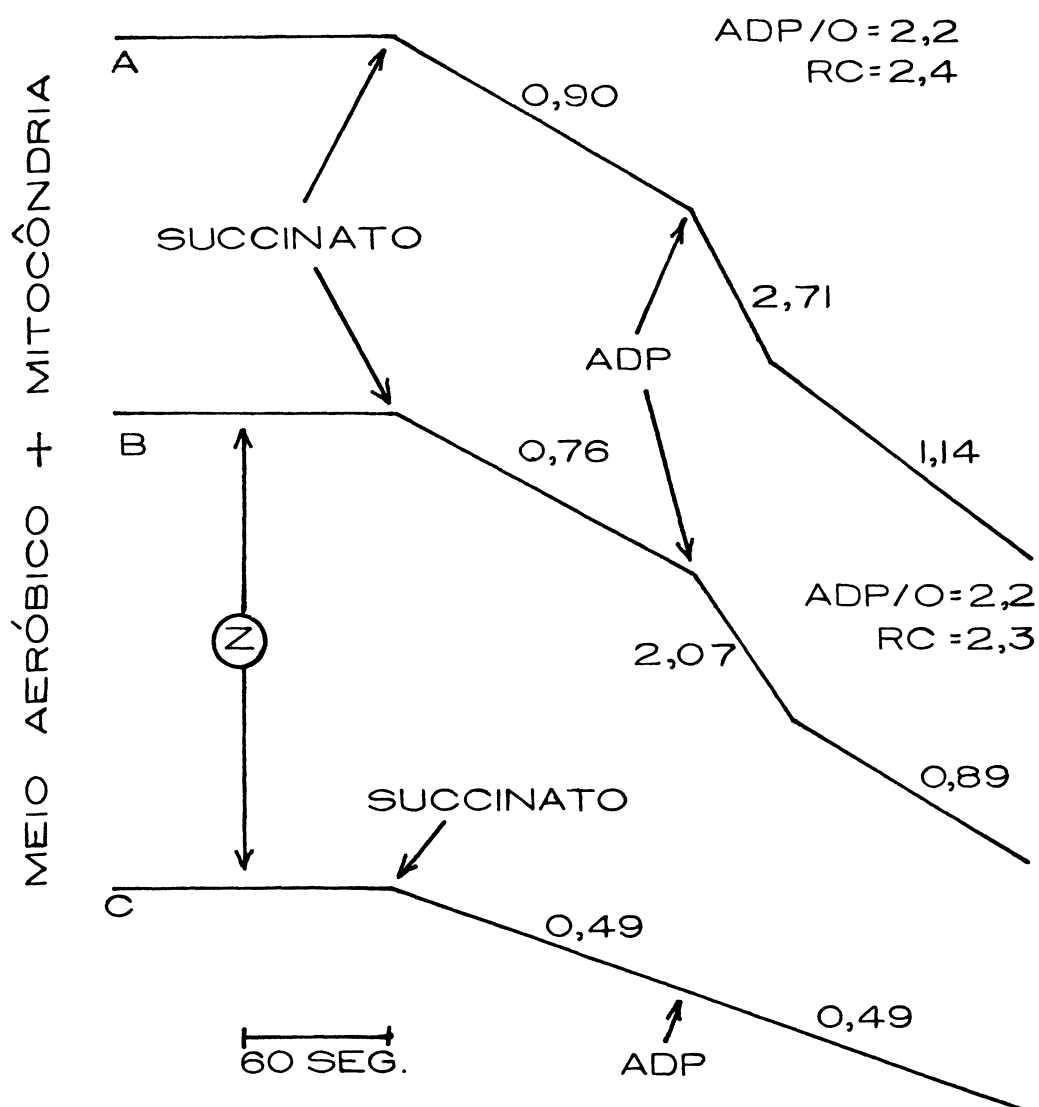


Figura 6 - Efeito do ZDDC sobre a fosforilação oxidativa por mitocôndrias de fígado de rato, utilizando-se o succinato como substrato.

Sistema: suspensão mitocondrial (1,5mg de proteína), succinato de sódio (100  $\mu$ moles), ADP (0,5  $\mu$ moles) e meio de reação (qsp 2,85ml). Os resultados são expressos em  $\mu$ MO/seg.

Curva A: sistema normal

Curva B: sistema em presença de ZDDC,  $3,2 \cdot 10^{-4}$  M

Curva C: sistema em presença de ZDDC,  $4,2 \cdot 10^{-4}$  M

3.6 - Concentração limiar do ZDDC para inibição da fosforilação oxidativa, usando-se  $\alpha$ -cetoglutaratato como substrato

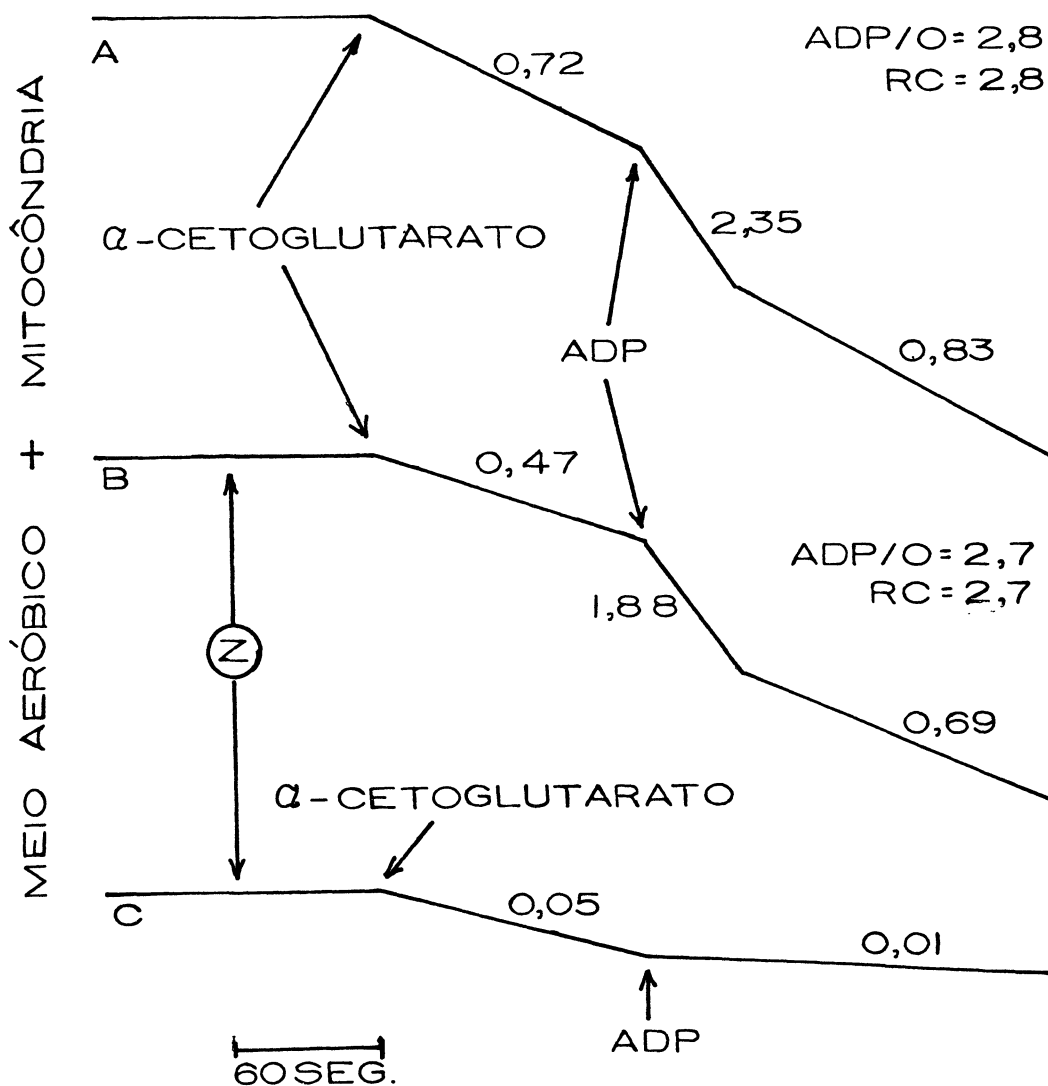


Figura 7 - Efeito do ZDDC sobre a fosforilação oxidativa por mitocôndrias de fígado de rato, utilizando-se o  $\alpha$ -cetoglutaratato como substrato. Sistema: suspensão mitocondrial (3mg de proteína),  $\alpha$ -cetoglutaratato de sódio (100  $\mu$ moles), ADP (0,5  $\mu$ moles) e meio de reação (qsp 2,85ml).

Curva A: sistema normal

Curva B: sistema em presença de ZDDC,  $3,2 \cdot 10^{-4}$  M

Curva C: sistema em presença de ZDDC,  $4,2 \cdot 10^{-4}$  M

3.7 - Concentração limiar do ZDDC para inibição da fosforilação oxidativa, usando-se glutamato como substrato

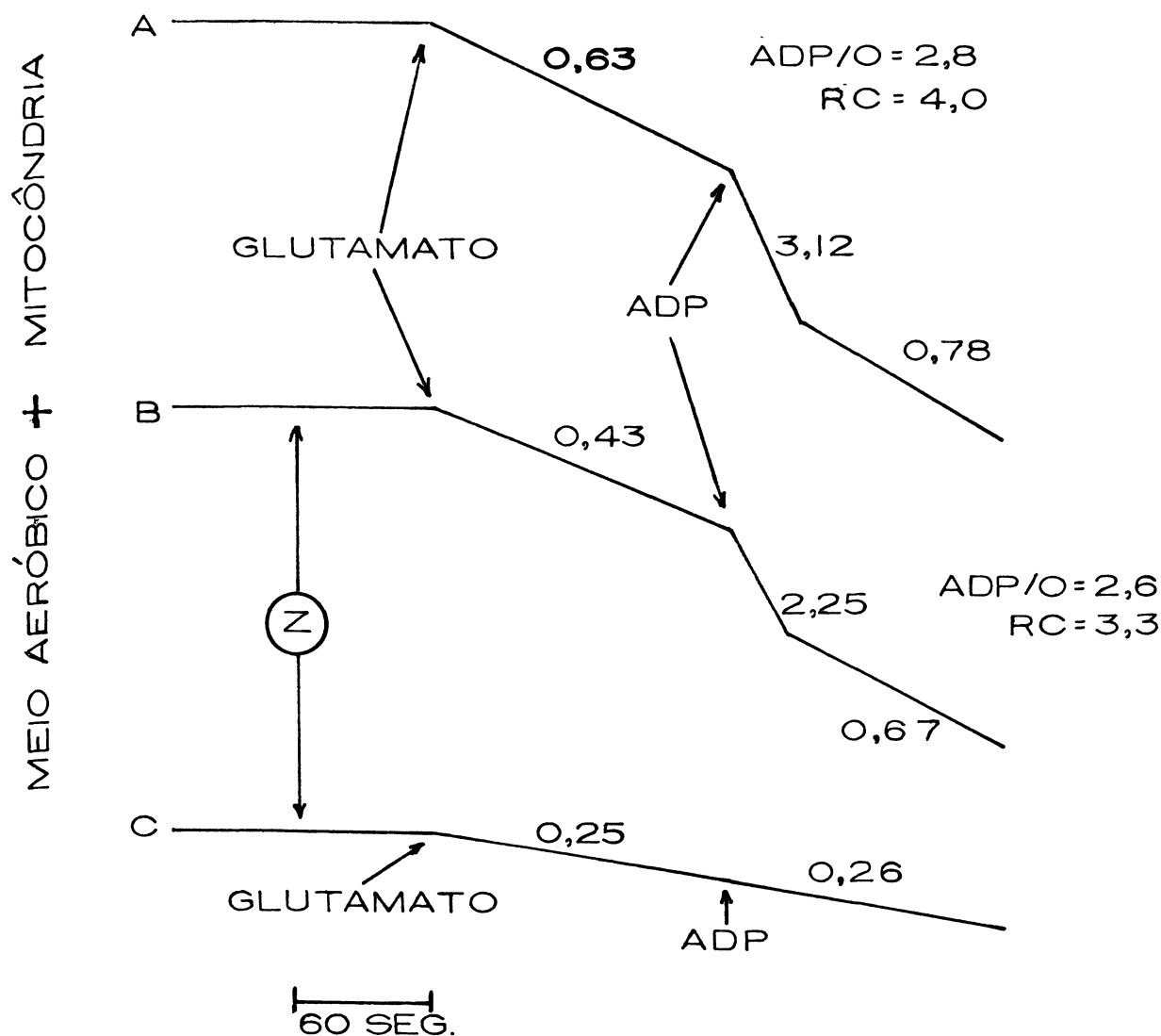


Figura 8 - Efeito do ZDDC sobre a fosforilação oxidativa por mitocôndrias de fígado de rato, utilizando-se o glutamato como substrato.

Sistema: suspensão mitocondrial (3mg de proteína), L-glutamato de sódio (100  $\mu$  moles), ADP (0,5  $\mu$  moles) e meio de reação (qsp 2,85ml). Os resultados são expressos em  $\mu$ MO/seg.

Curva A: sistema normal

Curva B: sistema em presença de ZDDC,  $3,2 \cdot 10^{-4}$  M

Curva C: sistema em presença de ZDDC,  $4,2 \cdot 10^{-4}$  M

3.8 - Concentração limiar do ZDDC para inibição da fosforilação oxidativa, usando-se isocitrato como substrato.

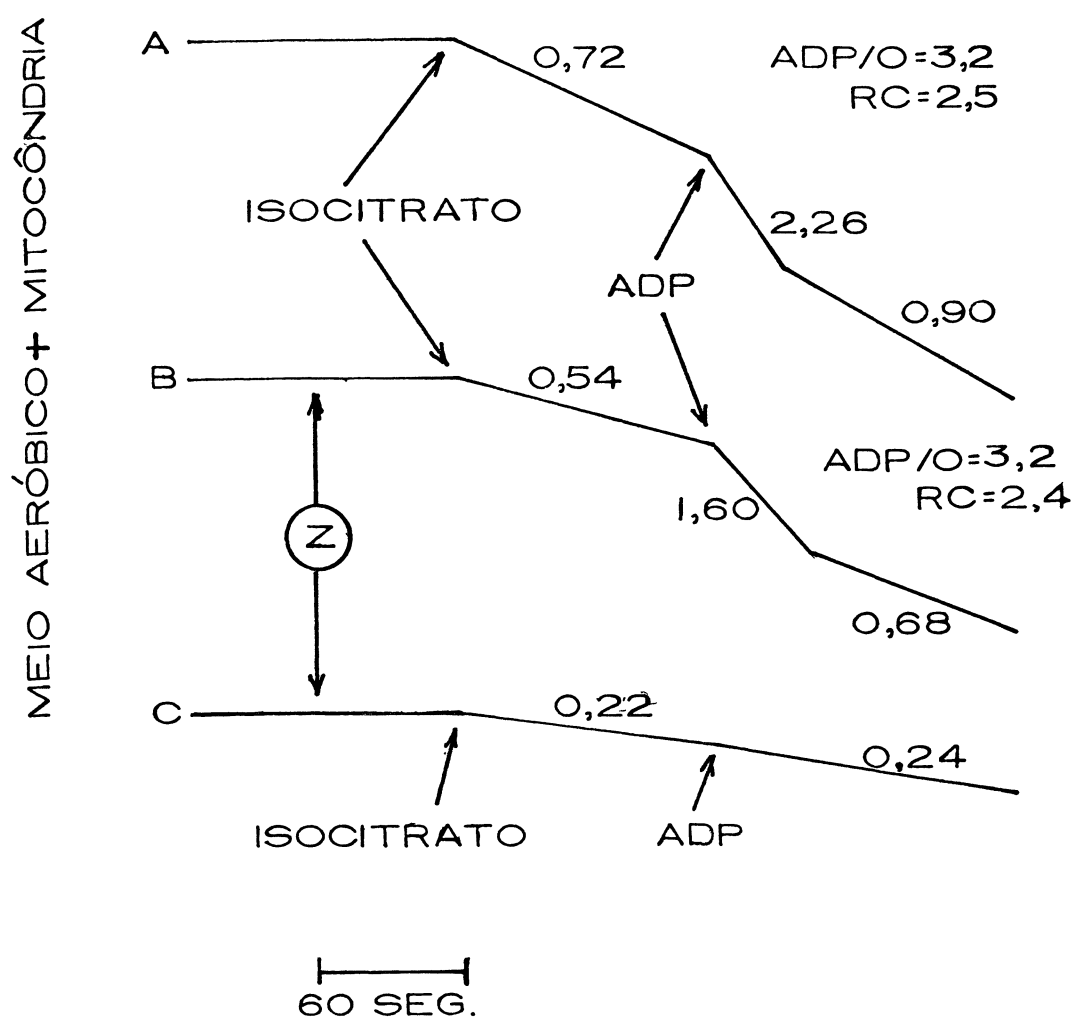


Figura 9. - Efeito do ZDDC sobre a fosforilação oxidativa por mitocôndrias de fígado de rato, utilizando-se o isocitrato como substrato.

Sistema: suspensão mitocondrial (3mg de proteína), isocitrato de sódio (100  $\mu$  moles), ADP (0,5  $\mu$  moles) e meio de reação (qsp 2,85ml).

Curva A: sistema normal

Curva B: sistema em presença de ZDDC,  $3,2 \cdot 10^{-4}$  M

Curva C: sistema em presença de ZDDC,  $4,2 \cdot 10^{-4}$  M



### 3.9 - Ação do ZDDC na fosforilação oxidativa e em mitocôndria desacoplada por 2,4-dinitrofenol.

Tabela I - Efeito do ZDDC sobre a fosforilação oxidativa em mitocôndria de fígado de rato e sobre a ação desacopladora do 2,4-dinitrofenol.

Substrato	est. 2	DNP	ZDDC	est. 3	est. 4	DNP	ADP/O	RC
succinato	0,63			2,19	0,69	1,88	2,9	3,2
	0,68		0,15	0,15	-	0,15	-	1,0
	0,64	1,94	0,19	0,19	-	-	-	-
$\alpha$ -cetoglutarato	0,57			2,75	0,60	2,64	3,1	4,5
	0,59		0,27	0,27	-	0,27	-	1,0
	0,56	2,72	0,31	0,31	-	-	-	1,0
glutamato	0,58			2,68	0,61	2,55	3,0	4,4
	0,56		0,33	0,33	-	0,33	-	1,0
	0,55	2,50	0,39	0,39	-	-	-	1,0
isocitrato	0,81			2,94	0,88	2,75	2,1	3,3
	0,83		0,37	0,37	-	0,37	-	1,0
	0,85	2,84	0,45	0,45	-	-	-	1,0

Sistema: suspensão mitocondrial (1,5mg de proteína para succinato e 3mg para os demais substratos), substrato (100  $\mu$  moles), ADP (0,5  $\mu$  moles), DNP ( $10^{-3}$   $\mu$  moles), ZDDC ( $4,2 \cdot 10^{-4}$  M) e meio de reação (qsp 2,85ml). Os resultados são expressos em  $\mu$  MO/seg.

3.10 - Proteção de grupos -SH mitocondriais contra a inibição da oxidação do succinato por ZDDC.

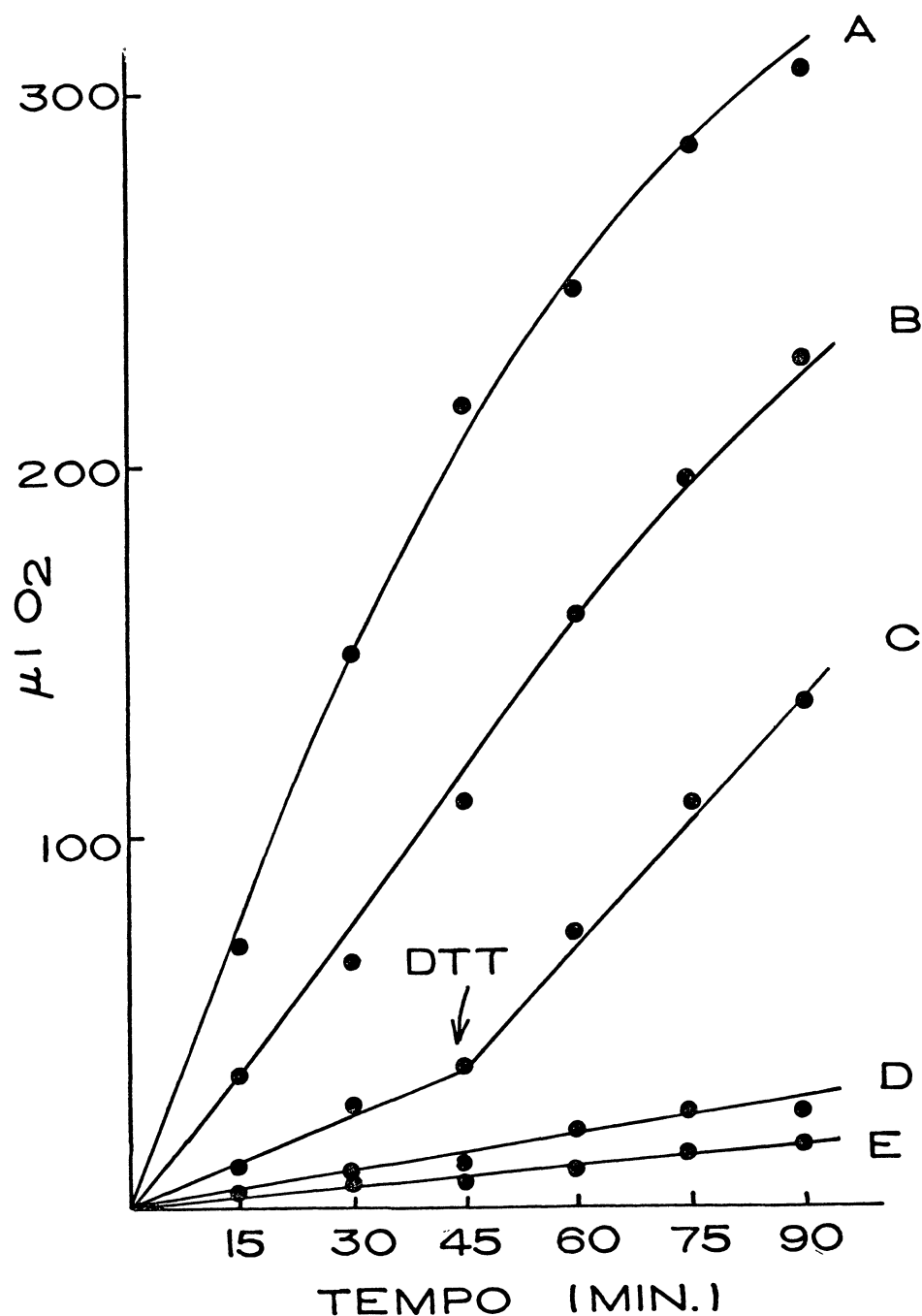


Figura 10 - Estudo da proteção de grupos -SH mitocondriais contra a inibição por ZDDC (respirometria). Utilizou-se o protetor de grupos -SH ditioeritritol (DTT).

Sistema: idêntico ao da Figura 2.

Curva A: respiração normal com succinato.

Curva B: respiração com succinato em presença de ZDDC ( $5,3 \times 10^{-4} \text{M}$ ) adicionado no "tipping" e de DTT (2mM) pré-incubado (10 minutos).

Curva C: respiração com succinato em presença de ZDDC ( $5,3 \times 10^{-4} \text{M}$ ) adicionado no "tipping" e DTT (2mM) adicionado aos 45 minutos.

Curva D: respiração endógena.

Curva E: respiração com succinato em presença de ZDDC ( $5,3 \times 10^{-4} \text{M}$ ) pré-incubado (10 minutos).

3.11 - Proteção de grupos -SH mitocondriais contra a inibição da oxidação do  $\alpha$ -cetrolutarato por ZDDC

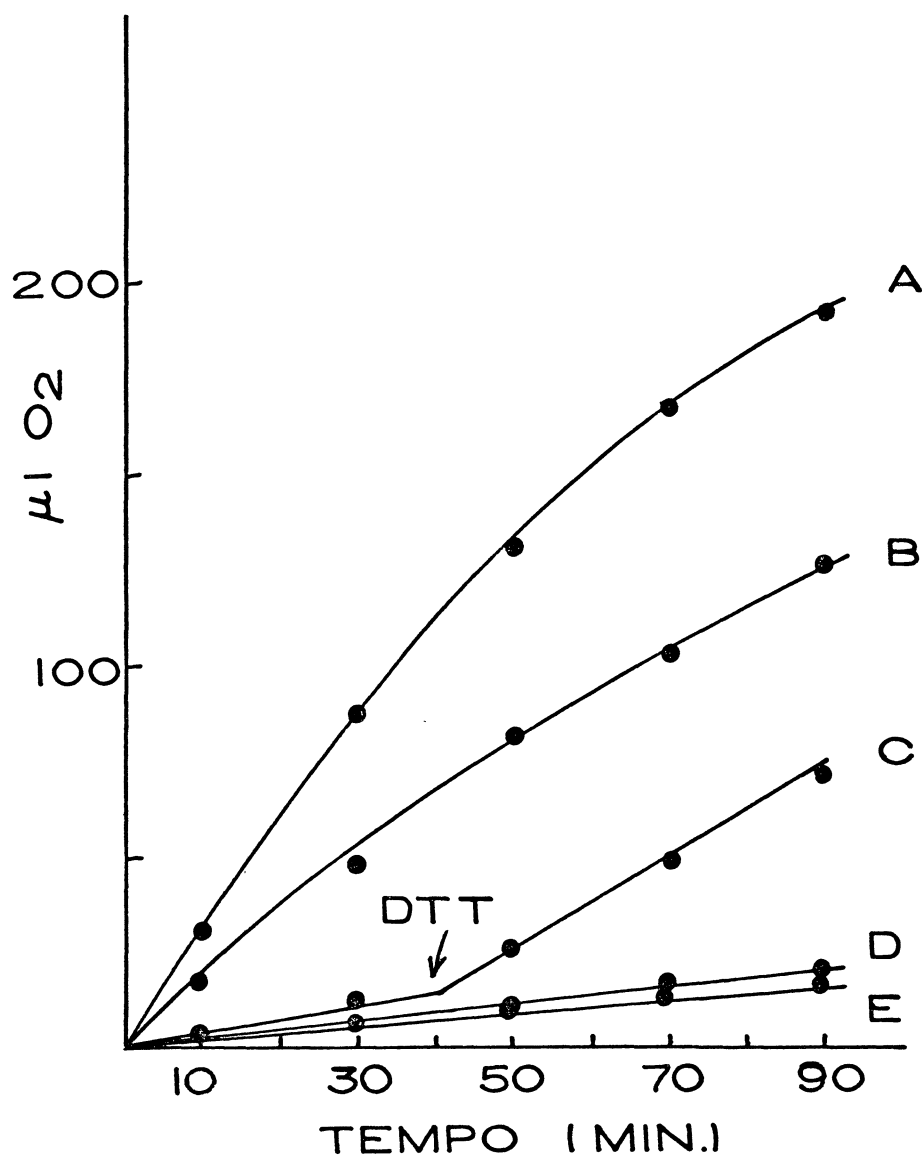


Figura 11 - Estudo da proteção de grupos -SH mitocondriais contra a inibição por ZDDC. (Respirometria).

Sistema: idêntico ao da figura 3.

Curva A: respiração normal com  $\alpha$ -cetoglutarato

Curva B: respiração para  $\alpha$ -cetoglutarato, em presença de ZDDC ( $2,3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) adicionado no "tipping" e de DTT (2mM) pré-incubado.(10 minutos).

Curva C: respiração com  $\alpha$ -cetoglutarato, em presença de ZDDC ( $2,3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) adicionado no "tipping" e de DTT (2mM) adicionado aos 40 minutos.

Curva D: respiração endógena

Curva E: respiração para  $\alpha$ -cetoglutarato em presença de ZDDC ( $2,3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) pré-incubado.(10 minutos).

3.12 - Proteção de grupos -SH mitocondriais contra a inibição da oxidação do glutamato por ZDDC.

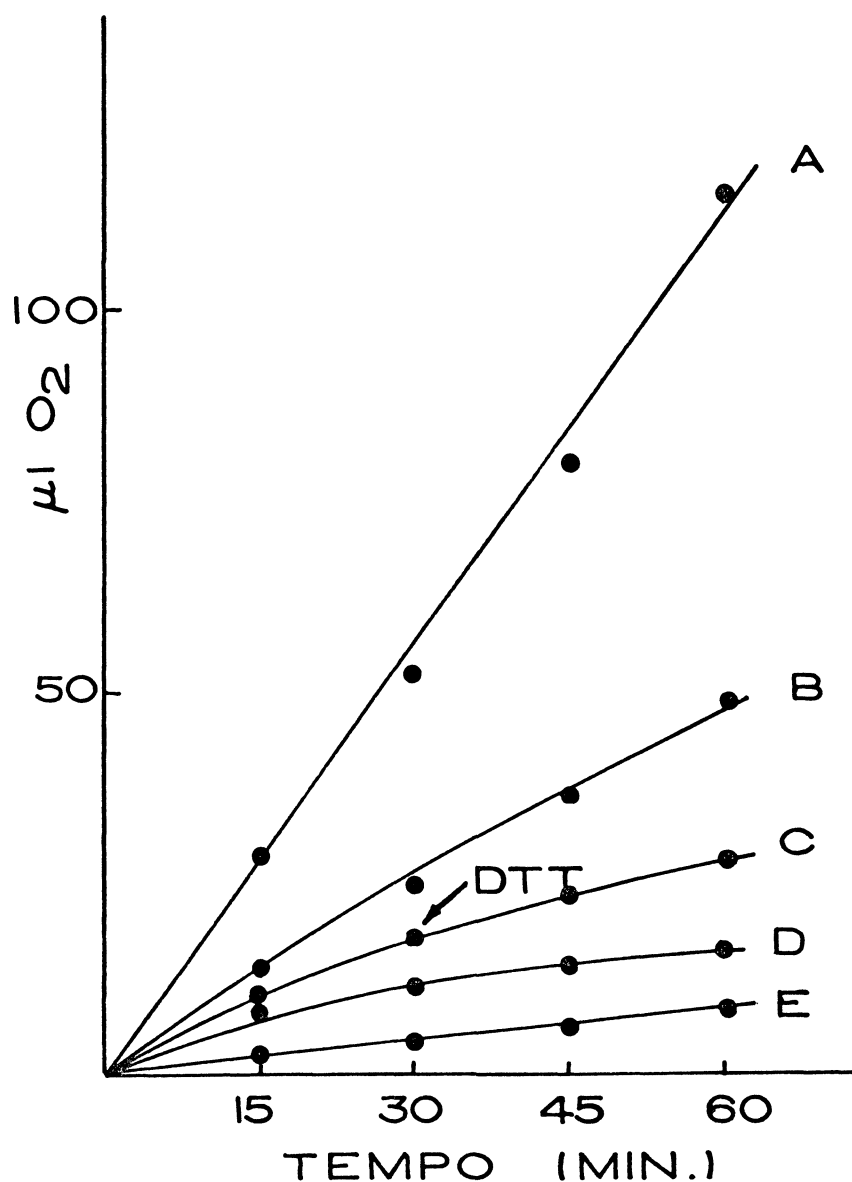


Figura 12 - Estudo da proteção de grupos -SH mitocondriais contra a inibição por ZDDC (respirometria).

Sistema: idêntico ao da Figura 4.

Curva A: respiração normal com glutamato.

Curva B: respiração com glutamato em presença de ZDDC ( $3,8 \times 10^{-4} \text{M}$ ) no "tipping" e DTT (2 mM) pré-incubado (10 minutos).

Curva C: respiração com glutamato em presença de ZDDC ( $3,8 \times 10^{-4} \text{M}$ ) adicionado no "tipping" e de DTT (2mM) adicionado aos 30 minutos.

Curva D: respiração endógena.

Curva E: respiração com glutamato em presença de ZDDC ( $3,8 \times 10^{-4} \text{M}$ ) pré-incubado (10 minutos).

3.13 - Proteção de grupos -SH mitocondriais contra a inibição da oxidação do isocitrato por ZDDC.

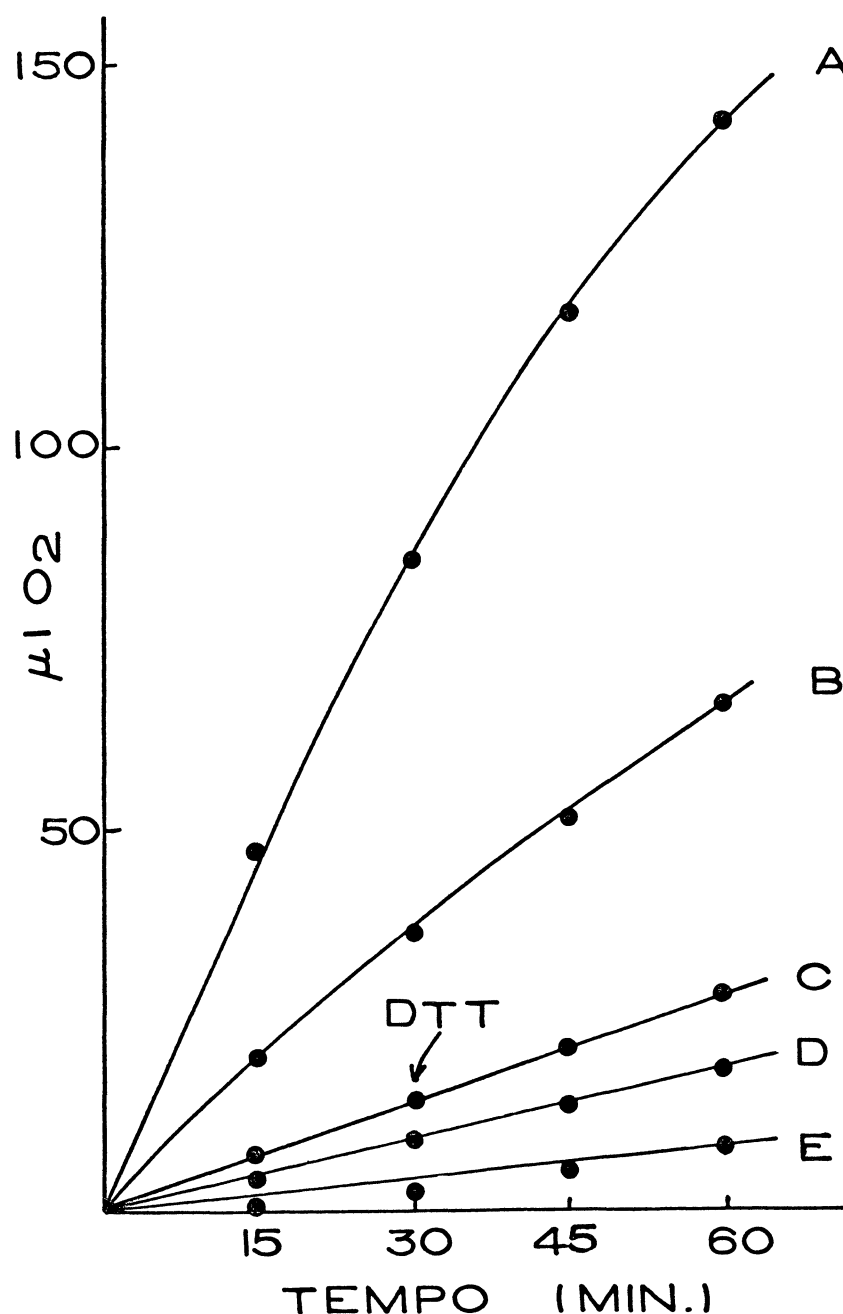


Figura 13 - Estudo da proteção de grupos -SH mitocondriais contra a inibição por ZDDC (respirometria).

Sistema: idêntico ao da Figura 5.

Curva A: respiração normal com isocitrato.

Curva B: respiração com isocitrato em presença de ZDDC ( $2,8 \times 10^{-4} \text{M}$ ) adicionado no "tipping" e DTT (2mM) pré-incubado (10 minutos).

Curva C: respiração com isocitrato em presença de ZDDC ( $2,8 \times 10^{-4} \text{M}$ ) adicionado no "tipping" e de DTT (2mM) adicionado aos 30 minutos.

Curva D: respiração endógena.

Curva E: respiração com isocitrato em presença de ZDDC ( $2,8 \times 10^{-4} \text{M}$ ) pré-incubado (10 minutos).

## 3.14 - Inibição da enzima succinato desidrogenase por ZDDC.

A enzima succinato desidrogenase foi isolada à partir de mitocôndrias de fígado de boi e foi ensaiada através de manometria. Constatou-se inibição da atividade por ZDDC, na concentração de  $7,7 \times 10^{-4} M$ .

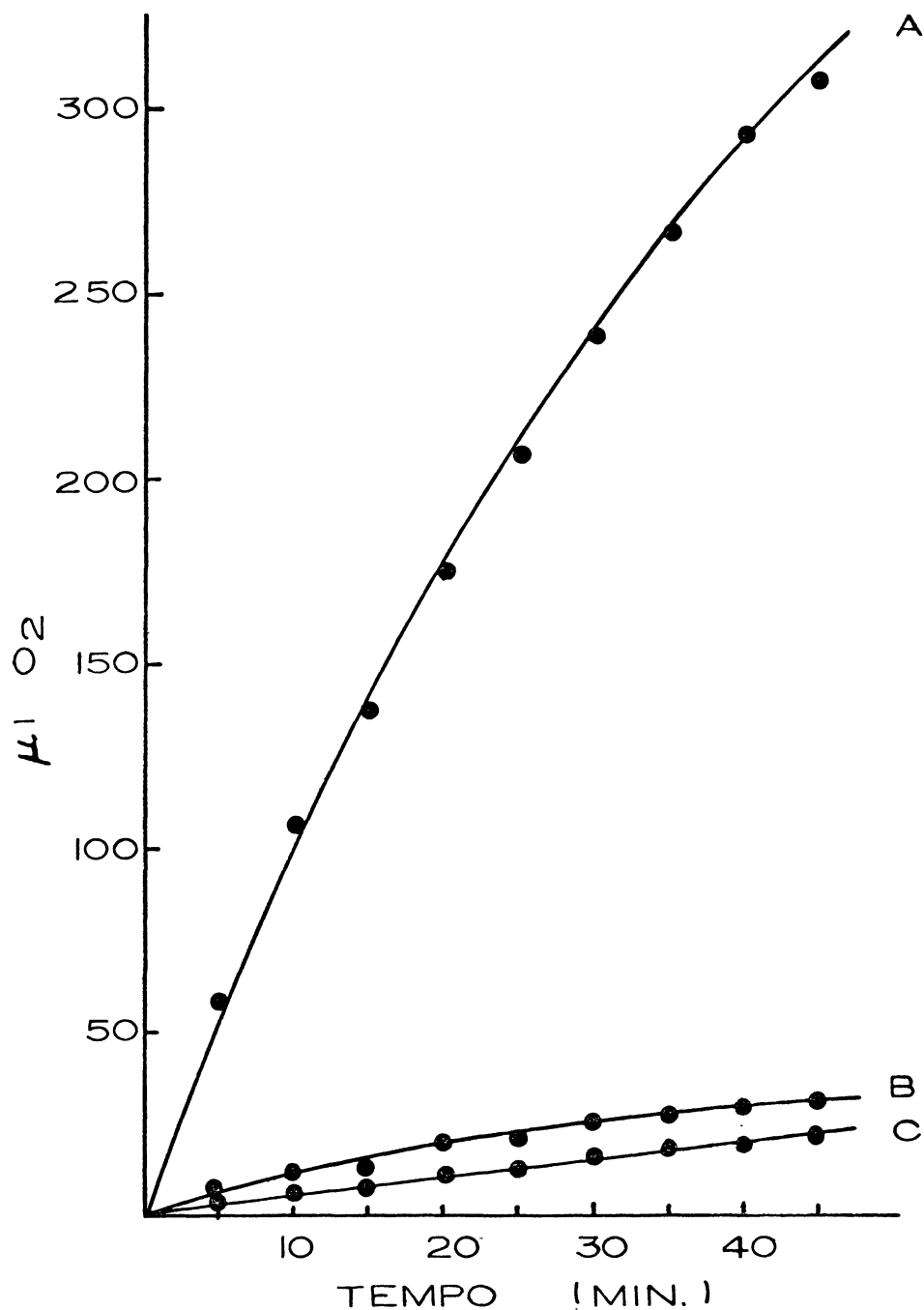


Figura 14 - Efeito do ZDDC sobre a atividade da succinato desidrogenase.

Sistema: KCN 0,01 M, 0,3 ml; fenazina metassulfato 1%, 0,1 ml; succinato de sódio 0,5M, 0,2 ml; soro albumina bovina cristalinna 1%, 0,1 ml; tampão fosfato 0,2M, pH 7,6 qsp 2,85 ml e suspensão da enzima, 2mg de proteína.

Curva A: curva normal com a enzima.

Curva B: enzima em presença de ZDDC ( $7,7 \times 10^{-4} M$ )

Curva C: enzima sem substrato (succinato).

## 3.15 - Efeito de ZDDC em "swelling" de mitocôndria de fígado de rato

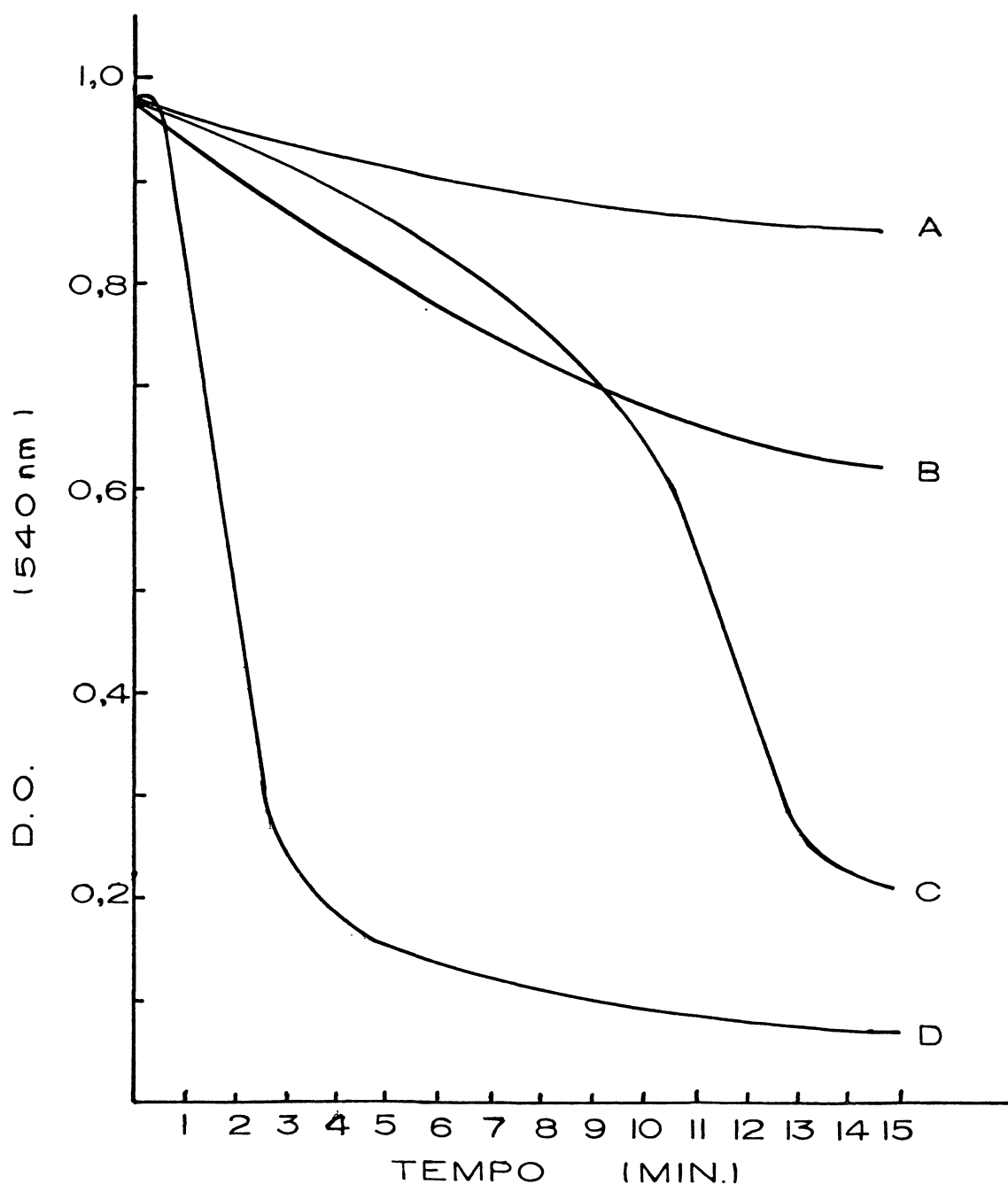


Figura 15 - Efeito do ZDDC em "swelling" de mitocôndrias de fígado.

Sistema: suspensão mitocondrial (1,5mg de proteínas), ZDDC (como indicado abaixo) e meio de reação (qsp 2,85ml)

Curva A: mitocôndrias em meio de reação

Curva B: mitocôndrias, meio de reação e ZDDC  $2,1 \cdot 10^{-4}$  M

Curva C: mitocôndrias, meio de reação e ZDDC  $3,4 \cdot 10^{-4}$  M

Curva D: mitocôndrias, meio de reação e ZDDC  $4,2 \cdot 10^{-4}$  M

### 3.16 - Efeito do Solvente

Como ZDDC foi usado dissolvido em dimetilformamida, tornou-se necessário testar o efeito do solvente em todos os sistemas experimentais. Não foi constatada interferência nos ensaios, sendo que os resultados estão isentos de alteração devido à dimetilformamida.



#### 4. DISCUSSÃO

#### 4. DISCUSSÃO

Sabe-se que os fungicidas que pertencem ao grupo DDC podem inibir o metabolismo em dois modos diferentes, ou inativando enzimas -SH dependentes, ou então quelando metais essenciais aos sistemas biológicos. Parece que o mecanismo mais aceito é o da inibição de grupos -SH enzimáticos.

Existem grupos -SH importantes para a atividade normal de desidrogenases do Ciclo do Ácido Tricarboxílico, bem como existem coenzimas que possuem grupos -SH livres em suas moléculas, sem os quais não conseguiriam ser eficientes em suas funções.

FAMAEY e WHITEHOUSE (10) demonstraram a presença de grupos -SH em membranas de mitocôndria. Várias enzimas de oxidação-redução requerem grupos -SH (1,23). Foi constatada a presença de grupos -SH essenciais para a atividade do sistema piruvato oxidase (2, 14, 43, 48, 49, 81), glutamato desidrogenase (3, 22, 57, 72, 80), succinato desidrogenase (2, 14, 15, 23, 24, 28, 73, 74, 76), isocitrato desidrogenase (8, 35, 51, 52),  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (2, 43, 59) e outras.

A oxidação de  $\alpha$ -ceto ácidos é altamente sensível à reagentes -SH e a inibição é facilmente liberada por compostos ditiólicos (como BAL), sugerindo o envolvimento de grupo ditiol no processo da oxidação, possivelmente como um grupo funcional do ácido dihidro-lipoico (23, 43, 65, 79). O ácido dihidro-lipoico é coenzima para certos sistemas enzimáticos mitocondriais responsáveis pela oxidação dos  $\alpha$ -ceto ácidos, e sua forma reduzida apresenta grupo -SH importante para sua função (17, 43, 53, 54, 55, 58, 60).

O efeito de ZDDC sobre sistemas enzimáticos mitocondriais responsáveis pela oxidação de certos substratos foi estudado em respirômetro de Warburg, medindo-se o consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas de fígado de rato. Utilizou-se succinato,  $\alpha$ -cetoglutarato, glutamato e isocitrato como substratos. Foi constatada forte inibição do consumo de oxigênio com qualquer dos substratos testados, a uma concentração de ZDDC da ordem de  $3.10^{-4}$  M. A concentração efetiva de ZDDC para inibir a oxidação de cada substrato foi determinada (figs. 2, 3, 4, e 5). A inibição da respiração foi confirmada em e

letródio de oxigênio.

Certos compostos tiólicos são capazes de antagonizar a ação dos inibidores -SH (13, 47, 85) como por exemplo 2,3-dimercaptopropanol (BAL), ditioneitol, cisteína, glutathion reduzido, Tioglicolato, mercaptoetanol, etc.

Tentou-se proteger os grupos -SH mitocondriais contra a ação do ZDDC, usando-se o protetor clássico ditioneitol (DTT). Foi verificado (Figs. 10, 11, 12, 13) que o DTT reduz em grande parte o efeito inibidor do ZDDC sobre os sistemas que oxidam succinato,  $\alpha$ -cetoglutarato, glutamato e isocitrato em mitocôndrias intactas de fígado de rato. Este resultado indica que os grupos -SH mitocondriais são o provável sítio de inibição para ZDDC.

A ação inibidora de ZDDC na atividade da succinato desidrogenase isolada e purificada a partir de fígado de boi foi estudada: no presente trabalho. Constatou-se forte inibição da atividade da enzima (Fig. 14) a uma concentração de ZDDC de  $7,7 \times 10^{-4} M$ . Provavelmente a inibição da atividade enzimática esteja relacionada ao bloqueio de grupos -SH da enzima.

Explorou-se também a ação de ZDDC sobre o mecanismo de acoplamento e fosforilação oxidativa, importantes no processo da conservação de energia liberada pelo transporte de electrons na cadeia respiratória. Os resultados revelaram que ZDDC é inibidor de fosforilação oxidativa em mitocôndrias de fígado de rato, com qualquer dos substratos utilizados: succinato,  $\alpha$ -cetoglutarato, glutamato e isocitrato (Figs. 6, 7, 8, 9 e Tabela I). A concentração de ZDDC mínima para que ocorra a inibição de fosforilação é de  $4,2 \times 10^{-4} M$ , para qualquer dos substratos.

Observa-se (Figs. 6, 7, 8, 9) que a concentração de ZDDC necessária para inibir a fosforilação oxidativa é maior para o succinato do que para os demais substratos. O efeito causado por igual concentração de ZDDC é semelhante quando se usa a metade da quantidade de proteína para o succinato do que para os demais substratos.

Como mostrado na Tabela I, em presença de ZDDC, não há estímulo da velocidade respiratória pela adição de ADP e nem pela adição do desacoplador 2,4-dinitrofenol. A respiração previamente estimulada pelo 2,4-dinitrofenol é

fortemente inibida pelo ZDDC. O mesmo ocorre com o ADP, isto é, o estímulo do consumo de oxigênio pelo ADP é inibido quando se adiciona ZDDC. O fato de que o 2,4-dinitrofenol não "libera" a inibição por ZDDC, pode ser indicativo de que ZDDC esteja agindo em sítio anterior ao sistema que é responsável pela resposta à adição do 2,4-dinitrofenol.

Existem grupos -SH importantes para o mecanismo de acoplamento e fosforilação oxidativa (18, 19, 20, 21, 29, 31, 32, 50). Possivelmente o efeito de ZDDC como inibidor de fosforilação oxidativa esteja associado ao bloqueio de grupos -SH essenciais para tal atividade.

Apesar dos intensos estudos já feitos com o propósito de se tentar esclarecer o mecanismo da fosforilação oxidativa, ainda não existe uma visão detalhada e correta a respeito do modo pelo qual a energia da oxiredução do transporte de elétrons é convertida em energia na forma de ligação fosfato do ATP. Existem teorias postuladas, sendo que as mais aceitas são a teoria quimiosmótica e a teoria conformacional. Aconteceria um equilíbrio dinâmico de transporte de íons através da membrana mitocondrial, e este equilíbrio produziria sucessivos estados conformacionais de alta energia, através de movimentos controlados da mitocôndria. Este estado de alta energia seria formado às custas da energia liberada pelo transporte de elétrons da cadeia respiratória e quando o "estado" fosse desfeito, a energia seria aproveitada para a formação do ATP a partir de  $ADP + Pi$ . Ocorreriam, assim, sucessivos "swellings" reversíveis e controlados, fenômeno denominado de oscilatória mitocondrial e que tem sido objeto de muitos estudos nos últimos tempos.

Sabe-se que para ocorrer a fosforilação oxidativa é necessário que a mitocôndria esteja intacta (com sua membrana íntegra) e que não devem existir alterações no sistema responsável pelo processo do transporte de íons através da membrana mitocondrial. Só assim poderiam ocorrer os sucessivos "swellings" controlados de mitocôndria que assegurariam o processo de conservação de energia sob a forma de ATP.

Pensou-se que o efeito causado pelo ZDDC como inibidor da fosforilação oxidativa poderia estar relacionado à alterações físico-químicas sobre a

membrana mitocondrial. O ZDDC poderia agir destruindo a integridade da estrutura mitocondrial. Analisou-se esta hipótese, estudando o efeito da droga em "swelling" mitocondrial. Utilizou-se para tal, o método turbidimétrico, que é suficientemente sensível para se constatar modificações na estrutura mitocondrial. ZDDC mostrou causar "swelling" irreversível nas mitocôndrias de fígado de rato (figura 15), quando se usa o mesmo meio de reação em que foi constatada a inibição da fosforilação oxidativa. Provavelmente este "swelling" mitocondrial irreversível seja o principal responsável pela inibição da fosforilação oxidativa. Como existem grupos -SH importantes para o transporte normal de íons e "swelling", ZDDC poderia talvez estar agindo ao nível destes grupos -SH.

GURD e WILCOX (16) apresentaram uma revisão a respeito da ligação de cátions metálicos com certos grupos funcionais de proteínas, peptídeos e aminoácidos. Certos metais são agentes formadores de mercaptídeos, sendo capazes de se ligar a grupos -SH de enzimas, impedindo assim sua função catalizadora (36).

A ação inibidora do ZDDC poderia estar relacionada ao bloqueio de grupos -SH enzimáticos pela formação de mercaptídeos através da ação do zinco metálico. Os estudos já feitos a respeito do mecanismo de ação tóxica dos compostos DDC sugerem que estas drogas agem como um todo, ou então através do íon ditiocarbamato (37, 56, 9). Segundo RICH e HORSFALL (56) o ZDDC não tem facilidade em produzir radicais livres. BRIQUET et al (4) dizem que o zinco não é o responsável pelo efeito do ZDDC. Parece que os efeitos produzidos pelo ZDDC não são devidos ao zinco metálico unicamente, mas sim à molécula como um todo, inativando enzimas que requerem grupos -SH para sua atividade, ou então quelando metais essenciais para os sistemas biológicos.

## 5. CONCLUSÕES

## 5. CONCLUSÕES

- Dimetilditiotiocarbamato de zinco (ZDDC) é inibidor da oxidação do succinato,  $\alpha$ -cetoglutarato, glutamato e isocitrato por mitocôndrias de fígado de rato. A inibição é revertida por DTT, indicando que ZDDC estaria agindo ao nível de grupos -SH mitocondriais.
- ZDDC é inibidor de fosforilação oxidativa em mitocôndrias de fígado de rato, sendo que o efeito sobre o succinato é menor do que para os substratos NAD-dependentes.
- ZDDC é inibidor da enzima succinato desidrogenase isolada à partir de fígado de boi.

## 6. SUMÁRIO



## 6. SUMÁRIO

Dimetilditiotiocarbamato de zinco (ZDDC) é um pesticida usado para o controle de doenças em vegetais causadas por fungos.

Estudou-se no presente trabalho os efeitos tóxicos de ZDDC a nível sub-celular, explorando-se a toxidez da droga no processo da Respiração Celular. Analizou-se a ação da droga sobre o consumo de oxigênio e a fosforilação oxidativa de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

Constatou-se o efeito inibitório de ZDDC sobre o consumo de oxigênio por mitocôndrias de fígado de rato, quando em presença de succinato,  $\alpha$ -cetoglutarato, glutamato e isocitrato. A inibição foi revertida por DTT, indicando que a droga age ao nível de grupos -SH ligados aos sistemas que oxidam os substratos.

Foi verificada a inibição da enzima succinato desidrogenase (enzima -SH) isolada a partir de fígado de boi.

Foi constatada também a inibição da fosforilação oxidativa em mitocôndrias de fígado de rato, possivelmente devido ao "swelling" significativo que foi constatado quando se usou sistema de ensaio semelhante àquele em que foi verificada a inibição da fosforilação oxidativa.

## 7. AGRADECIMENTOS

## 7. AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

- 1- ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Pr.
- 2- à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica
- 3- à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).
- 4- ao Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná.
- 5- à FIDENE (Fundação de Integração, Desenvolvimento e Educação do Noroeste do Estado), Ijuí, RS, entidade à qual estou vinculada profissionalmente.
- 6- aos professores Dr. Annibal P. Campello e Dr. Dinor O. Voss.
- 7- aos amigos e colegas, cujo estímulo e apoio nunca faltaram

## 8. BIBLIOGRAFIA

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 01 - BARRON, E.S.G. Thiol groups of biological importance. In: NOORD, F.F. ed. Advances in Enzymology. New York, Interscience Publishers, 1951, v. 2, p. 201-226.
- 02 - BARRON, E.S.G. & SINGER, T.P. Studies on biological oxidations: sulphydryl enzymes in carbohydrate metabolism. J. Biol. Chem., 157: 221-240, 1945.
- 03 - BITENSKY, M.W. et al. The effect of allosteric modifiers on the rate of denaturation of glutamate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 240: 1077-1082, 1965.
- 04 - BRIQUET, M. et al. Ziram, a sulphydryl reagent and specific inhibitor of yeast mitochondrial desidrogenases. Arch. Biochem. Bioph., 174: 684-694, 1976.
- 05 - CASIDA, J.E. Insecticide biochemistry. Ann. Rev. of Biochemistry, 42: 259-278, 1973.
- 06 - CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylations: kinetics of oxygen utilization. J. Biol. Chem., 217: 383-393, 1955.
- 07 - CHEFURKA, W. Oxidative metabolism of carbohydrates in insects: glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the housefly *Musca domestica*. Enzymologia, 18: 209-227, 1957.
- 08 - COX, G.F. Isocitrate dehydrogenase (NAD specific) from pea mitochondria. In: LOWENSTEIN, J.M. ed. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1969, v. 13, p. 47-51.
- 09 - DUBOIS, K.P. et al. Inhibitory action of dithiocarbamates on enzymes of animal tissues. Toxicol. Appl. Pharmacol., 3: 236-255, 1961.
- 10 - FAMAËY, J.P. & WHITEHOUSE, M. W. Interaction between monsteroidal anti-inflammatory drugs and biological membranes: effects of monsteroidal anti-inflammatory drugs and of varios ions on the availability of sulphydryl groups on lymphoid cells and mitochondrial membranes. Biochem.

Pharmacol., 24: 1609-1615, 1975.

- 11 - FLOCKHART, I.R. & CASIDA, J.E. Relationship of the acylation of membrane esterases and proteins to the teratogenic action of organophosphorus insecticides and eserine in developing hen eggs. Biochem. Pharmacol., 21: 2591-2603, 1972.
- 12 - GOKSØYR, J. Reversal of the fungicidal effect of dithiocarbamyl compounds. Nature, 175: 820-821, 1955.
- 13 - GOKSØYR, J. The effect of some dithiocarbamyl compounds on the metabolism of fungi. Physiol. Plantarum, 8: 719-835, 1955.
- 14 - GORDON, J.J. & QUASTEL, J.H. Effects of organic compounds on tissue enzymes and proteins and on tissue metabolism. Nature, 159: 97-98, 1947.
- 15 - GORDON, J.J. & QUASTEL, J.H. Effects of organic arsenicals on enzyme systems. Biochem. J., 42: 337-350, 1948.
- 16 - GURD, F.R.N. & WILCOX, P.E. Complex formation between metallic cations and proteins, peptides and aminoacids. Advances in Protein Chemistry, 11: 311-427, 1956.
- 17 - HÄGER, L.P. et al. Mechanism of pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase systems. Fed. Proc., 12: 213, 1953.
- 18 - HATASE, O. et al. Mitochondrial sulfhydryl groups a possible endogenous probe of conformational changes in the mitochondrial membrane. J. Biochem., 82: 359-363, 1977.
- 19 - HAUGAARD, N. et al. Effects of a disulfide (Ellman's reagent) and thiols on oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria. Biochem. Pharmacol., 18: 2385-2391, 1969.
- 20 - HAUGAARD, N. et al. The role of sulfhydryl groups in oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria. Biochem. Biophys. Acta, 172: 198-204, 1969.
- 21 - HAUGAARD, N. et al. The actions of disulfiram and 2,2'-dithiopyridine on oxidative phosphorylation and ion transport by rat liver mitochondria. Biochem. Pharmacol., 19: 2669-2671, 1970.

- 22 - HELLERMAN, L. et al. L-glutamic acid dehydrogenase: role of enzyme sulphydryl groups. J. Biol. Chem., 233: 1468-1478, 1958.
- 23 - HOPKINS, F.G. & MURGAN, E. J. The influence of thiol-groups in the activity of dehydrogenases. Biochem. J., 32: 611-620, 1938.
- 24 - HOPKINS, F.G. et al. The influence of thiol groups in the activity of dehydrogenases: with an addendum on the location of dehydrogenases in muscle. Biochem. J., 32: 1829-1848, 1938.
- 25 - JAKOBY, W. B. Aldehyde oxidation: evidence for closely juxtaposed sulphydryl groups on dehydrogenases. J. Biol. Chem., 232: 89-97, 1958.
- 26 - JAKOBY, W.B. Aldehyde dehydrogenases. In: BOYER, P.D. & LARDY, H. ed. The Enzymes. 2ed. New York, Academic Press, 1963, v. 7, p.203-221.
- 27 - JANSSEN, M.J. The stability constants of metal complexes of some dialkyl-dithiocarbamic acids: copper complexes in ethanol/water mixtures of various compositions. Rec. Trav. Chim., 76: 827-835, 1957.
- 28 - KEILIN, D. & HARTREE, E.F. Activity of the succinic dehydrogenase: cytochrome system in different tissue preparations. Biochem. J., 44: 205-218, 1949.
- 29 - KHALIL, S.A. Effects of 6,6'-dithiodinicotinic acid, a thiol reagent on several mitochondrial functions: coupling mechanism, ATPase and anion transport. Biochem. Pharmacol., 24: 49-56, 1975.
- 30 - KING, T.E. Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. In: ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. ed. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1967, v. 10, p. 322-331.
- 31 - KURUP, C.K.R. & SANADI, D.R. Studies on oxidative phosphorylation: sulphydryl involvement in the energy - transfer pathway. Biochemistry., 7: 4483-4491, 1968.
- 32 - LAM, K.W. Sulphydryl group involvement in a soluble energy transfer factor of the Oxidative Phosphorylation System, Arch. Biochem. Biophys., 123: 642-643, 1968.

- 33 - LOTSPEISCH, W.D. & PETERS, R.A. The action of sulphydryl inhibitors upon isocitric dehydrogenase with especial reference to the behavior of some trivalent arsenicals. Biochem. J., 49: 704-709, 1951.
- 34 - LOWRY, O.M. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- 35 - LUDWIG, R.A. & THORN, G.D. Chemistry and mode of action of dithiocarbamate fungicides. Adv. in Pest Control Res., 3: 219-252, 1960.
- 36 - MADSEN, N.B. Mercaptide-forming agents. In: HOCHSTER, R.M. & QUASTELL, J.H. ed. Metabolic Inhibitors, a Comprehensive Treatise. New York, Academic Press, 1963, v.2, p.119-143
- 37 - MANTEN, A. et al. Investigations on organic fungicides: the antimicrobial spectrum of the antifungal substance tetramethylthiuram disulphide. Ant. v. Leeuwenhoek J. Microbial Ser. 16: 45-55, 1950.
- 38 - MANTEN, A. et al. Investigations on organic fungicides: the influence of essential trace metals upon the fungitoxicity of tetramethylthiuram disulphide and 8-hydroxyquinoline. Ant. v. Leeuwenhoek L. Microbial Ser., 17: 58-68, 1951.
- 39 - MARLIAC, J.P. Toxicity and teratogenic effects of 12 pesticides in the chick embryo. Feder. Proceed., 23: 105, 1964.
- 40 - MARSH, R.W. Some applications of laboratory biological tests of the evaluation of fungicides. Annal. Appl. Biol. 25: 583-604, 1938.
- 41 - MONTGOMERY, H.B.S. & SHAW, H. Behaviour of thiuram sulphides, etc., in spore germination tests. Nature, 151: 333, 1943.
- 42 - MYGAARD, A.P. & SUMNER, J.B. D-Glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase; a comparison with liver aldehyde dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 39: 119-128, 1952.
- 43 - OCHOA, S. Enzymic mechanisms in the citric acid cycle. Advances in Enzymology, 15: 183-270, 1954.
- 44 - ONG, E.R. Synthetic organic insecticides, fungicides and repellents. In: ONG, E.R. ed. Chemistry and uses of pesticides. 2ed. New York, Reinhold Publishing Corporation, 1956, p.182-154.



- 45 - OWENS, R.G. Studies on the nature of fungicidal action: inhibition of sulphhydryl-, amino-, iron-, and copper-dependent enzymes in vitro by fungicides and related compounds. Contrib. Boyce Thompson Inst., 17: 221-242, 1953.
- 46 - OWENS, R.G. Studies on the nature of fungicidal action: effects of fungicides on poliphenol oxidase in vitro. Contrib. Boyce Thompson Inst., 17: 473-487, 1954.
- 47 - PETERS, R.A. & STOCKEN, L.A. British anti-lewisite (BAL) Nature, 156: 616-619, 1945.
- 48 - PETERS, R.A. & Wakelin, R.W. Observations upon the relation between sulphhydryl groups and pyruvate oxidation in brain tissue. Biochem J., 40: 513-516, 1946.
- 49.- PETERS, R.A. et al. An analysis of the inhibition of the pyruvate oxidation by arsenicals in relation to the enzyme theory of vesication. Biochem. J., 40: 516-526, 1946.
- 50 - PIALOUX, N.S. & GAUTHERON, D. Tree. -SH variations during ATP synthesis by oxidative phosphorylation in heart muscle mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 234: 9-15, 1971.
- 51 - PLAUT, G.W.E. Isocitrate dehydrogenases. In: BOYER, P.D., LARDY, H. & MYRBACK, K. ed. The Enzymes. 2ed. New York, Academic Press, 1963, v.7, p. 105-126.
- 52 - PLAUT, G.W.E. Isocitrate dehydrogenase (DNP specific) from bovine heart. In: LOWENSTEIN, J.M. ed. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1969, v.13, p.34-42.
- 53 - REED, L.J. Lipoic acid. In: BOYER, P.D., LARDY, H. & MYRBACK, K., ed. The Enzymes, 3ed., NEW York, Academic Press, 1960, v.3, p.195-223.
- 54 - REED, L.J. Chemistry and function of lipoic acid. In: FLORKIN, M. & STOTZ, E.H. ed. Comprehensive Biochemistry. New York, Elsevier Publish. Company, 1966, v.14, p.99-126.
- 55 - REISS, O.K. & HELLERMAN. Pyruvate utilization in heart sarcosomes: inhibition by an arsenoso compound and reactivation by lipoic acid. J. Biol. Chem., 231: 557-569, 1958.

- 56 - RICH, S. & HORSFALL, J.G. Fungicides as metabolic inhibitors. In: HOCHSTER, R.M. & QUASTELL, J.H. ed. Metabolic inhibitors, a comprehensive treatise. New York, Academic Press, 1963, v.2, p.263-284
- 57 - ROGERS, K.S. Variable sulphhydryl activity toward silver nitrate by reduced glutathione and alcohol, glutamate and lactate dehydrogenases Bioch. Biophys. Acta., 263: 309-314, 1972.
- 58 - SANADI, D.R. Pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate oxidation enzymes. In: BOYER, P.D., LARDY, H. & MYRBACK, K. ed. The Enzymes. 2ed. New York, Academic Press, 1963, v.7, p.307-344.
- 59 - SANADI, D.R.  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase from pig heart. In: LOWENSTEIN, J.M. ed. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1969, v.13, p.52-55.
- 60 - SEAMAN, G.R. Removal of thiotic acid from enzyme proteins. Fed.Proc. 13: 731-732, 1954.
- 61 - SHEPARD, H.H. Synthetic Organic Insecticides II. In: SHEPARD, H.H. The Chemistry and Action of Insecticides. 1ed. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1951, 269-335.
- 62 - SHARVELLE, E.G. The carbamate fungicides. The nature and uses of modern fungicides. 1<sup>st</sup> ed. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1961, 91-115.
- 63 - SIEBERT, G. et al. The enzymatic properties of isocitric dehydrogenase. J. Biol. Chem., 226: 977-991, 1957.
- 64 - SIJPESTEIJN, A.K. & JANSSEN, M.J. Fungitoxic action of 8-hydroxyquinoline, piridine, N-oxide-2-thiol and sodium dialkyldithiocarbamates, and their copper complexes. Nature, 182: 1313-1314, 1958.
- 65 - SIJPESTEIJN, A.K. & JANSSEN, M.J. On the mode of action of dialkyldithiocarbamates on moulds and bacteria. Ant. v. Leeuwenhoek J. Microbiol. Ser., 25: 422-438, 1959.
- 66 - SIJPESTEIJN, A.K. & KERK, G.J.M. van der. Investigations on organic fungicides: histidine as an antagonist of tetra-methylthiuram disulphide (T.M.T.D.) and related compounds. Ant. v. Leeuwenhoek J. Microbiol. Ser., 18: 83-106, 1952.

- 67 - SIJPESTEINJN, A.K. & VAN DER KERK, G.J.M. Investigations on organic fungicides: the antagonistic action of certain imidazole derivatives. and of  $\alpha$ -keto acids on the fungitoxicity of dimethyldithiocarbamates Biochim. Biophys. Acta., 15: 69-77, 1954.
- 68 - SIJPESTEINJN, A.K. & KERK, G.J.M. van der. Investigations on organic fungicides: the biochemical mode of action of bisdithiocarbamates and diisothiocynates. Biochim. Biophys Acta., 13: 545-552, 1954.
- 69 - SIJPESTEINJN, A.K. & VAN DER KERK, G.J.M. Investigations on organic fungicides: piruvic acid accumulation and ist relation to the phenomenon of inversion growth as effected by sodium dimethyldithiocarbamate Biochim. Biophys. Acta., 19: 280-288, 1956.
- 70 - SIJPESTEINJN, A.K. et al. The role of metals in the fungitox action of sodium dimethyldithiocarbamate. Biochim. Biophys. Acta., 21: 398-399, 1956.
- 71 - SIJPESTEINJN, A.K. et al. Investigations on organic fungicides: the role of metals and chelating agents in the fungitoxic action of sodium dimethyldithiocarbamate (NaDDC). Biochim. Biophys. Acta., 23: 550-557, 1957.
- 72 - SINGER, T.P. & BARRON, E.S.G. Studies on biological oxidations: sulphydril enzymes in fat and protein metabolism. J. Biol. Chem., 157: 241-253, 1945.
- 73 - SINGER, T.P. et al. Isolation and properties of succinic dehydrogenase. Bioch. Biophys. Acta., 17: 154-155, 1956.
- 74 - SINGER, T.P. et al. Studies on succinic dehydrogenase isolation and properties of the dehydrogenase from beef heart. J. Biol. Chem., 223: 599-613, 1956.
- 75 - SINGER, T.P. Flavoprotein dehydrogenases of the respiratory chain. In: FLORKIN, M. & STOTZ, E.H. ed. Comprehensive Biochemistry. New York, Elsevier Publish. Company, 1966, v.14, p.127-198.
- 76 - SINGER, T.P. et al. Succinate dehydrogenase. Advances in Enzymology, 37: 189-272, 1973.

- 77 - SISLER, H.D. & COX, C.E. Effects of tetramethylthiuram disulfide on anaerobic breakdown of glucose by brewer's yeast. Amer. Jour. Bot. 42: 351-356, 1955.
- 78 - SISLER, H. D. & MARSHALL, N.L. Physiological effects of certain fungi - toxic compounds on fungus cells. J. Wash. Acad. Sci., 47: 321-329 1957.
- 79 - SLATER, E.C. Effect of sulphydril-combining compounds on the activity of the succinic oxidase system. Biochem. J., 45: 130-142, 1949.
- 80 - SMITH, E. et al. Glutamate dehydrogenase. In: BOYER, P.D. ed. The Enzymes. 3ed. New York, Academic Press, 1975, v.11, p.293-367.
- 81 - STOCKEN, L.A. et al. British anti-lewisite: antidotal effects against therapeutic arsenicals. Biochem. J., 41: 47-51, 1947.
- 82 - UMBREIT, W.W. et al. Constant volume manometry - the "Warburg". In: Manometric & Biochemical Techniques. 5 ed. Minneapolis, Burgess Publishing Co. 1972, p. 1-19.
- 83 - VOSS, D.O. et al. The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 4: 48-51, 1961.
- 84 - VOSS, D.O. et al. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. Analit. Biochem., 6: 211-222, 1963.
- 85 - WATERS, L.L. & STOCK, C. BAL (British anti-lewisite) Science, 102: 601-606, 1945.

## 9. SIGLAS

DDT = diclorodifeniltricloroetano  
DDC = dialquilditioicarbamato  
ZDDC = dimetilditioicarbamato de zinco  
TMTD = tetrametiltiuram dissulfeto  
TETD = tetraetiltiuram dissulfeto  
FeDDC= dialquilditioicarbamato de ferro  
CuDDC= dialquilditioicarbamato de cobre  
NaDDC= dialquilditioicarbamato de sódio  
DTT = ditioeritritol